

(51) 国際特許分類6 <b>C12N 15/11, 7/00, 7/02, A23L 3/3463, A61K 2/16</b>	<b>A1</b>	(11) 国際公開番号 <b>WO98/08944</b>  (43) 国際公開日 1998年3月5日(05.03.98)
(21) 国際出願番号 PCT/JP97/02957  (22) 国際出願日 1997年8月26日(26.08.97)  (30) 優先権データ 特願平8/261132      1996年8月26日(26.08.96)      JP 特願平9/130236      1997年4月14日(14.04.97)      JP 特願平9/135716      1997年4月19日(19.04.97)      JP  (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) バイオベンチャーバンク株式会社 (BIO VENTURE BANK CO., LTD.)(JP/JP) 〒355-01 埼玉県比企郡吉見町久保田1501 Saitama, (JP) (71) 出願人 ; および (72) 発明者 高橋正士(TAKAHASHI, Seishi)(JP/JP) 〒297 千葉県茂原市綱島245-18 Chiba, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 錦織浩治(NISHIKORI, Koji)(JP/JP) 〒365 埼玉県鴻巣市松原4-1-35 Saitama, (JP)		(81) 指定国    AU, CA, KR, NZ, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  添付公開書類 国際調査報告書 請求の範囲の補正の期限前であり、補正費受領の際には再公開される。
(54) Title: <b>NOVEL BACTERIOPHAGE, METHOD FOR SCREENING THE SAME, NOVEL BIOBACTERICIDAL MATERIALS PREPARED WITH THE USE OF THE SAME, AND REAGENT FOR DETECTING THE SAME</b>  (54) 発明の名称    新規なバクテリオファージならびにそのスクリーニング法およびそれを使用した新規バイオ殺菌材料ならびに検出用試薬  (57) Abstract A bacteriophage which has an extremely high specificity for specific pathogenic bacteria and, therefore, can surely exterminate the bacteria serving as the host by the phagocytic action thereof. Novel biobactericidal materials prepared with the use of the action of this phage are usable in sterilizing anything to be protected against the infection with pathogenic bacteria, for example, foodstuffs such as fresh foods and kitchens in restaurants and schools so as to exterminate the corresponding bacteria. These biobactericidal materials may contain a mixture of two or more bacteriophages differing in properties. Such materials are highly useful, since two or more pathogenic bacteria can be exterminated thereby at the same time. Not human being, etc. but the pathogenic bacteria serving as the host are exclusively infected with the above-mentioned phage, which makes the phage highly safe. Moreover, it has an extremely potent efficacy. The bacteriophage having a high specificity exclusively for specific pathogenic bacteria and thus being an extremely safe biobactericidal material usable in anything to be protected against the infection with pathogenic bacteria, for example, foodstuffs such as fresh foods and kitchens in restaurants and schools; a method for easily screening the phage; a process for producing the phage; a stabilizer for stabilizing the phage or a preservative therefor; and a reagent and a reagent kit for conveniently detecting the pathogenic bacteria within a short period of time by using the phage.		

この発明で使用するバクテリオファージはある特定の種類の病原性細菌にだけ極めて高い特異性を持っているので、その宿主となる病原性細菌を食菌作用によって確実に殺菌することができる。このファージの作用を利用して、新規バイオ殺菌材料は、生鮮食品などの食料品や、レストラン、学校給食等において食材に調理する場所など、病原性細菌の感染を予防すべきあらゆるものに使用して、対応する細菌を殺菌することができる。また、このバイオ殺菌材料には、2種以上の性質の異なるバクテリオファージのカクテルを含んでいてもよく、同時に2種以上の病原性細菌を砂金することができる極めて有用なものである。また、ファージは、その宿主となる病原性細菌にだけ感染し、ヒトなどには一切感染しない極めて安全で、また、効力も非常に強いものである。

ある特定の種類の病原性細菌に対してだけ高い特異性を有するバクテリオファージは、生鮮食品などの食料品や、レストラン、学校給食等において食材に調理する場所など、病原性細菌の感染を予防すべきあらゆるものに使用できる極めて安全なバイオ殺菌材料である。また、このファージを簡単にスクリーニングする方法ならびにそのファージを製造する方法が提供され、更にはそのファージを安定化する安定化剤もしくは保存剤を提供されている。その上、そのファージを利用して病原性細菌を簡便にかつ短時間で検出する試薬ならびに試薬キットが提供される。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に記載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード (参考情報)

AL	アルバニア	ES	スペイン	LK	スリランカ	SE	スウェーデン
AM	アルメニア	FI	フィンランド	LR	リベリア	SG	シンガポール
AT	オーストリア	FR	フランス	LS	レソト	SI	スロヴェニア
AU	オーストラリア	GA	ガボン	LT	リトアニア	SK	スロヴァキア共和国
AZ	アゼルバイジャン	GB	英国	LU	ルクセンブルグ	SL	シエラレオネ
BA	ボスニア・エルツェゴビナ	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SN	セネガル
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MC	モナコ	SZ	スワジランド
BE	ベルギー	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ共和国	TD	チャド
BF	ブルキナ・ファソ	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TG	トーゴ
BG	ブルガリア	GW	ギニアビサウ	MK	マケドニア共和国	TJ	タジキスタン
BJ	ベナン	HU	ハンガリー	ML	マリ	TM	トルクメニスタン
BR	ブラジル	ID	インドネシア	MN	モンゴル	TR	トルコ
BY	ベラルーシ	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	TT	トリニダード・トバゴ
CA	カナダ	IL	イスラエル	MW	マラウイ	UA	ウクライナ
CF	中央アフリカ共和国	IS	アイスランド	MX	メキシコ	UG	ウガンダ
CG	コンゴ	IT	イタリア	NE	ニジェール	US	米国
CH	スイス	JP	日本	NL	オランダ	UZ	ウズベキスタン
CI	コート・ジボアール	KE	ケニア	NO	ノルウェー	VN	ヴェトナム
CM	カメルーン	KG	キルギスタン	NZ	ニュージーランド	YU	ユーゴスラビア
CN	中国	KP	朝鮮民主主義人民共和国	PL	ポーランド	ZW	ジンバブエ
CU	キューバ	KR	大韓民国	PT	ポルトガル		
CZ	チェコ共和国	KZ	カザフスタン	RO	ルーマニア		
DE	ドイツ						

## 明 細 書

新規なバクテリオファージならびにそのスクリーニング法および  
それを使用した新規バイオ殺菌材料ならびに検出用試薬

### 技 術 分 野

この発明は、新規なバクテリオファージならびにそのスクリーニング法およびそれを使用した新規バイオ殺菌材料ならびに検出用試薬に関するものである。更に詳細には、この発明は、病原性大腸菌を含む各種病原性細菌類に高い特異性を有する新規なバクテリオファージ、そのスクリーニング法ならびにかかるバクテリオファージを単独もしくは混合したカクテルとして用いる新規バイオ殺菌材料、その安定化剤およびバクテリオファージを用いた病原性細菌検出用試薬もしくは試薬キットに関するものである。

### 背 景 技 術

自然界には様々な種類の細菌が分布しており、腐敗や発酵などの重要な生活現象を営むものも多く存在している。かかる細菌のうちには、いわゆる病原性細菌といわれる細菌が存在していて、その病原性細菌は、ヒトや、イヌ、ネコなどのペットなどの動物を始め、各種植物にも感染して、疾患や病的症状などの病害の起源を与える細菌であって、かかる動植物の体組織内に侵入増殖して病害を与えるものも多数知られている。

かかる病原性細菌の1種である大腸菌は、自然界のいたるところに存在しており、ヒトや哺乳動物の腸管内に常在する細菌でもある。かかる大腸菌のほとんど全てのものは、通常はヒトや哺乳動物などには何ら害を及ぼさない。ところが、大腸菌のうちには腸管出血性大腸菌などのようないわゆる病原性大腸菌が存在し、この病原性大腸菌はヒトや哺乳動物などに感染して重大な結果を及ぼす場合もある。

そのような病原性大腸菌などの病原性細菌からの感染を予防するためにまたは大腸菌などの細菌に感染した場合の治療のために、従来より多くの種類の殺菌剤が

使用されている。例えば、傷口の消毒にはヨウ素を含んだ殺菌剤であるヨードチンキ、クロルヘキシジンを含むマキロン等が良く使われている。更に、食品にも添加できる防腐剤としては安息香酸などもよく使われてきている。また細菌感染症の予防もしくは治療には種々の有効な抗生物質が使用されている。

最近発生した病原性大腸菌、つまり腸管出血性大腸菌による感染の場合のように、生の牛レバーによる感染、カイワレ大根、レタス等の野菜を通じて腸管出血性大腸菌が感染した恐れがでた場合には、刺身による感染、レアステーキを通じてなどの感染までが疑われてしまうことにもなる。しかしながら、このような生鮮食品などの食料品からの感染を防御するために使える殺菌剤となると、ヨードチンキ、マキロンなどは毒性の問題によりこのような目的には到底使用できるものではない。また、細菌感染症の予防もしくは治療に使用されている抗生物質などを、病原性大腸菌などの食料品への感染防御の目的では到底使用することはできない。

また、仮に安全な殺菌剤が存在したとしても生鮮食品に用いた場合、均一に噴霧することは困難であるので大きな濃度差が生まれ、殺菌効果の局所によるムラができてしまう。このことは殺菌効果のモレを意味するので重大である。

更に、ポリリジン等のように殺菌作用を有していなくても細菌の繁殖を抑えることができるいわゆる静菌作用を有した物質も知られているが、ポリリジンの場合、0.5-1%の高濃度に使用せねばならず、生鮮食品などの食料品に使用した場合、味覚の変化が予想され、高価であり、静菌作用のムラも予想される。

このように人間に無害で生鮮食品などの食料品などに使用することができる殺菌材は存在しないため、学校給食などにおける生野菜などの食料品などの殺菌には、結局のところ熱湯による消毒が行われているのが現状である。したがって、生鮮食品などの食料品などに使用することができて、かつ、ヒトに対して安全な殺菌材料の開発が要請されている。

ところで、バクテリオファージ（以下、単に「ファージ」と略称する場合もある）とは、蛋白質と核酸のみからなり、それぞれ特定の細菌を宿主として特定の細菌の中でのみ増殖できる生物と無生物の中間のものであり、また非常に小さく電子顕微鏡でしか観察することはできない。バクテリオファージは、細菌を宿主として細菌

のみにしか感染せず、感染した細菌を食べ尽くして子孫を増やしていくことが知られている。現在、各種細菌を宿主とする数多くのバクテリオファージが知られていて、例えば、サルモネラにはサルモネラを宿主とする特有のファージ、ピブリオにはピブリオを宿主とする特有のファージが知られている。また、大腸菌を宿主として食菌破壊するファージも多数知られていて、これまでに約 300 種程知られていて、空気中にも多数存在している。これらのバクテリオファージのいずれも大腸菌に感染するが、人間やその他の哺乳動物に対しては全く無害である。同様に、大腸菌以外の細菌を宿主とするファージも人間やその他の哺乳動物に対しては全く感染せず無害である。

しかしながら、かかるバクテリオファージは、細菌のみにしか作用しないこと、更には宿主とする細菌への特異性が高く、ある特定の細菌のみにしかまたはごく少数の複数の特定の細菌にしか作用しないことが知られている。例えば、大腸菌に作用するファージも例外ではなく、全てのもしくは多くの異なる種類の大腸菌に作用することはできず、良く知られた T2 ファージも C 型大腸菌には作用できないことも知られている。このようにバクテリオファージは、これまで研究対象としてのみ使われてきて遺伝子研究には多大の進歩をもたらしてきたけれども、他方その特異性が高すぎるために、バクテリオファージを産業上利用することなどこれまで大して注目されもしなかつた。したがって、かかるバクテリオファージを殺菌剤として利用することなどこれまで考えられたことはなかった。

以上のように各種細菌を宿主とするバクテリオファージは多数知られているが、これまで、腸管出血性大腸菌などの病原性細菌を宿主とするバクテリオファージは知られていなかった。

他方、バクテリオファージの宿主となる細菌のうち、特に大腸菌はその増殖力が極めて強く、20分ないし30分に1回分裂をして、条件がよければ、1匹の大腸菌が1日に1グラムにまで増殖する。前述したように、大腸菌は、自然界のいたるところに存在していて、ヒトや哺乳動物の腸管内にも常在する細菌であって、通常はヒトや哺乳動物などには何ら害を及ぼさない。かかる大腸菌の性質を利用して、いわゆるバイオ医薬品の多くは大腸菌を培養して製造されている。

前述したように、これまで、腸管出血性大腸菌などの病原性細菌を宿主とするバクテリオファージは知られていなかったけれども、従来のバクテリオファージのスクリーニング法でもスクリーニングすることはできるが、かかるバクテリオファージを効率的にかつ確実にスクリーニングする方法は未だ確立されていないといえる。そこで、かかるバクテリオファージを効率的にかつ確実にスクリーニングするスクリーニング法を開発することも要請されている。

更にまた、生鮮食品などの食料品などに直接使用することのできる有効な殺菌剤は市販されていないといえる。したがって、生鮮食品などの食料品などに直接使用することができる製品を開発することが要請されている。

かかる殺菌剤を開発する当たってはまた、その殺菌剤を、生鮮食品などの食料品などに直接使用する場合、特にその安全性を確保しながら、長期間保存することができるように安定化剤もしくは保存剤を開発することも要請されている。

従来、ファージ保存液としては、トリス塩酸緩衝液、燐酸緩衝液等が良く知られているが、これらはこれまで研究用にのみ使われてきたものであって、生鮮食品などの食品などに直接使用することはできない。また、これまで生鮮食品に直接噴霧できて飲用可能なファージ保存液は全く知られていなかった。

また、これまで病原性細菌の感染による食中毒などが発生した場合には、その原因となる感染病原性細菌を特定するのには、ある程度の日数が必要であった。したがって、腸管出血性大腸菌などの病原性細菌が感染して引き起こされた食中毒などの場合には、早急な治療を施すためには、その感染細菌の特定が迅速になされることが必要である。そこで、腸管出血性大腸菌などの病原性細菌を短時間にかつ確実に検出できる検出用試薬やかかる試薬キットの開発も要請されている。

## 発 明 の 開 示

上記要請に応えるべく、本発明者らは、上述したようなバクテリオファージの特異的な作用に着目して鋭意努力した結果、ある特定のバクテリオファージが病原性大腸菌を特異的に殺菌することを見出すと共に、そのバクテリオファージを含む殺菌材料を生鮮食品などの食料品などに使用した場合でも、かかる病原性大腸菌を殺

菌することができ、生鮮食品などの食料品などの安全性を確保することができることを見出した。

したがって、この発明は、病原性細菌に対してだけ極めて高い特異性を示すバクテリオファージを提供することを目的としている。

また、この発明は、かかる高い特異性を持つバクテリオファージを効率的にかつ確実にスクリーニングすることができるスクリーニング法を提供することを目的としている。

更に、この発明は、バクテリオファージを生鮮食品などの食料品に直接使用した場合でも極めて高い安全性を確保しながら、ファージを長期間安定化させることができるバクテリオファージを含んだバイオ殺菌材料を提供することを目的としている。

更にまた、この発明は、バクテリオファージを含んだかかるバイオ殺菌材料において、ファージを生鮮食品などの食料品に使用した場合でも極めて高い安全性を確保しながら、ファージを長期間安定化させることができるファージ用保存剤を提供することを目的としている。

加えて、この発明は、バクテリオファージの食菌作用を利用して、その宿主となる病原性細菌を効率よく、短時間でかつ確実に検出することができるバクテリオファージ検出用試薬もしくはその試薬キットを提供することを目的としている。

なお、この明細書において使用する「病原性細菌」という用語は、ヒトや、イヌ、ネコなどのペットなどの動物に感染して疾患や病的症状の起源を与える細菌であって、かつ、バクテリオファージの宿主となってそのバクテリオファージによって食菌破壊される細菌を意味し、例えば、腸管出血性大腸菌を含む病原性大腸菌などを含む病原性細菌を総称するものであると理解すべきである。また、この明細書においては、病原性細菌として、その代表的な細菌といえる大腸菌について説明するが、大腸菌はあくまでも病原性細菌の代表であって、病原性細菌の例示として説明されているものであって、この発明がかかる例示に限定されるものではないことも理解されるべきである。

前述した目的を達成するために、この発明は、病原性細菌に対してだけ高い特異性を有するバクテリオファージを提供している。

この発明はまた、その好ましい態様として、ある特定の種類の病原性大腸菌に対してだけ高い特異性を有するバクテリオファージを提供している。

また、この発明によって、ある特定の種類の病原性大腸菌に対してだけ高い特異性を有する新規なバクテリオファージが提供されることによって、多様な病原性大腸菌を含む病原性細菌に対して有用なバクテリオファージを使用して幅広い要請に応えていくことが可能となる。

更に、この発明は、病原性細菌に対してだけ高い特異性を有するバクテリオファージを効率的にかつ確実にスクリーニングするためのスクリーニング法を提供している。

この発明は、病原性細菌に対してだけ高い特異性を有するバクテリオファージを含む新規バイオ殺菌材料を提供している。かかる新規バイオ殺菌材料は、そのバクテリオファージが人体などに全く悪影響を及ぼすことなく、感染の恐れのある病原性細菌を食菌破壊することができることを利用して、生鮮食品などの食料品に対しても直接使用することができる。

また、この発明によって提供される新規バイオ殺菌材料には、かかるバクテリオファージは 2 種以上の性質の異なるバクテリオファージのカクテルからなっていて、複数の異なる病原性細菌に対して同時に対処できるようになっている。

更に、この新規バイオ殺菌材料には、そのバクテリオファージを安定してかつ長期間保存することができるバクテリオファージの培養液の安定化剤または保存剤が含有されることによって、この新規バイオ殺菌材料はその安全性と安定性を確保しながら、長期間保存することができる。

この発明はまた、バクテリオファージを培養しているその宿主である細菌に感染させて増殖させることによってバクテリオファージの培養液を得ることを特徴とするバクテリオファージの培養液の製造方法を提供するものである。

この発明の好ましい態様として、病原性細菌を培養する培地にカルシウムイオンを含有させることによって、特に病原性細菌に高い特異性を有するバクテリオファ



ージを増殖させることができる製造方法を提供している。

この発明は更に、バクテリオファージの培養液を安定してかつ長期間保存することができるバクテリオファージの培養液の安定化剤または保存剤を提供している。

この発明はその更なる別の態様として、特異性を有するバクテリオファージを利用して、病原性細菌が存在するかどうかを確実に、簡単にかつ短時間に検出することができる病原性細菌検出用キットを提供している。

### 図面の簡単な説明

図 1 は、プレート上におけるクロス・ストリーク法による殺菌効果を示す図であって、この図においてはテストバクテリオファージと接触した菌は完全に殺菌されていることが示されている。

図 2 は、液体培地中での本剤の効果を示す図であって、図中、(一)は本剤を加えていない時の菌の増殖カーブを示し、(+)は本剤を  $MOI=10$  で加えた場合菌の増殖が抑制されていることを示している。

図 3 は、バクテリオファージの培養状態を示す図である。第 3 図において、ア)は、寒天培地のみを培養したシャーレを示し、イ)は、寒天培地で腸管出血性 0157 を培養したシャーレを示し、この図では、腸管出血性 0157 の増殖によってシャーレが白くなっていることが判明する。ウ)は、寒天培地上で腸管出血性 0157 とともに病原性大腸菌 0157 のみを食菌破壊するファージの原液( $2 \times 10^{10}/\text{ml}$ )を添加して培養したものを示していて、この図においては、腸管出血性 0157 はすべて食菌破壊されてしまっていることが判明する。エ)は、寒天培地上で腸管出血性 0157 とともに、新規ファージ保存液で前記ファージを 1,000 倍に希釈した液( $2 \times 10^7/\text{ml}$ )を添加して培養したものを示していて、この図においては、腸管出血性 0157 はすべて食菌破壊されていることが示されている。オ)は、寒天培地上で、腸管出血性 0157 とともに、新規ファージ保存液で前記ファージを 1,000 倍に希釈した液( $2 \times 10^7/\text{ml}$ )をさらに水道水で 20 倍希釈後のものを添加して培養したものを示していて、この図においては、腸管出血性 0157 はすべて食菌破壊されていることが示されている。

力)は、寒天培地上で、腸管出血性 O157 とともに、新規ファージ保存液で前記ファージを 1,000 倍に希釈した液( $2 \times 10^7$ /ml)をさらに水道水で 100 倍希釈後のものを添加して培養したものを示していて、この図においては、腸管出血性 O157 はすべて食菌破壊されていることが示されている。

### 発明を実施するための最良の態様

#### (バクテリオファージ)

バクテリオファージは、ウシなどの家畜や、イヌ、ネコ等のペット、ハト、カラスなどの鳥、鶏などの家禽などの多くの動物の排泄物や、下水などに存在していることは広く知られていて、かかる排泄物や下水などから分離することができることも知られている。

この発明において使用できるバクテリオファージは、その起源に関係なく、腸管出血性大腸菌を含む病原性大腸菌などの病原性細菌に対して高い特異性を有するものであればいずれもこの発明の目的を達成するために利用することができ、ある特定の種類のファージに限定されるものではない。つまり、かかるバクテリオファージとしては、その宿主となる病原性細菌に吸着して特異的にその細菌を溶菌破壊して、この発明の目的を達成することができるバクテリオファージであればいずれも使用することができる。そのようなバクテリオファージとしては、例えば、大腸菌に対しては、T系ファージ (T1、T2、T3、T4、T5、T6、T7 など)、 $\phi$  X-174、 $\lambda$ 、 $\phi$  X80、Q  $\beta$ 、P1 などの他に、この発明に係るスクリーニング法によってスクリーニングされた新規なバクテリオファージも当然のことながら挙げられる。また、大腸菌の他にも、バチルスサチルスに対しては、SZP01、SP02 などのバクテリオファージなどが挙げられる。

かかるバクテリオファージのうち、特に、下記配列表に示す配列番号 1-1 ないし 1-4、配列番号 2-1 ないし 2-10、配列番号 3-1 ないし 3-5 または配列番号 4-1 ないし 4-5 でそれぞれ示される塩基配列を有するフラグメントを含む DNA を持つことを特徴とするバクテリオファージはそれぞれ、腸管出血性大腸菌 O157 に対して高い特異性を有するものである。これらのバクテリオファージの

DNA配列はそれぞれ下記に示す方法によって同定された。

(バクテリオファージのスクリーニング法)

従来より分子生物学の研究に使用されてきた多くのバクテリオファージは、この発明が対象とする病原性細菌、特に腸管出血性大腸菌などの病原性大腸菌を溶解することができないことが判明した。

かかるバクテリオファージをスクリーニングする従来法によっても、この発明に係る高い特異性を有するバクテリオファージをスクリーニングすることは可能である。しかしながら、病原性細菌、特に腸管出血性大腸菌などの病原性大腸菌などに対して高い特異性を有するバクテリオファージをスクリーニングすることができスクリーニング法は今で確立されていない。そこで、そのスクリーニングの効率と確実性を高めるために、下記のようなバクテリオファージのスクリーニング法を工夫し、自然界より、特に腸管出血性大腸菌などの病原性大腸菌などに対して高い特異性をもって溶解することができるバクテリオファージをスクリーニングすることができることを見出した。

この発明においては、様々な動物の排泄物や下水などの試料を採集して、それらの試料中に存在すると思われる病原性細菌に対して高い特異性を有するバクテリオファージをスクリーニングするために、そのサンプルを、まず、例えば、大腸菌K株、B株およびC株で制限酵素マイナス ( $r^{-}$ ) で修飾酵素ポジティブ ( $m^{+}$ ) の宿主に感染させてそのサンプル中に存在するファージを増幅する。この溶菌液を病原性細菌にプレートして、単一プラークを分離し、このような操作を数回繰り返して数段の増幅を行って高タイターストックを得る。このうち、ほぼ完全に溶菌したクリアーなプラークだけを選択して、次の段階として、高温 (55℃-65℃) でEDTA に数時間接触させて自然に存在する欠失DNAを含むファージのみを選択する。この操作を数回繰り返すことによって、安定で必須遺伝子のみを有するファージを選択することができる。

(バクテリオファージの培養)

この発明に係る新規バクテリオファージの培養法について、大腸菌を宿主とするバクテリオファージを培養する場合を例として説明する。

まず、大腸菌を、ポリペプトン、イーストエキストラクトなどを含む培地において、室温でまたは加温して大腸菌の菌体数が所定の数になるまでジャーファーメンターなどの培養器を用いて培養する。大腸菌の菌体数が所定の数、例えば、 $2-3 \times 10^8/\text{ml}$ 、になった段階（例えば、 $\text{OD}=0.2$ ）で、バクテリオファージを培地に添加する。バクテリオファージを添加した後、従前と同じ条件で更に培養を継続すると、バクテリオファージは大腸菌に感染して、バクテリオファージは大腸菌の菌体内で増殖し、大腸菌を完全に破壊する。その結果、培養を所定時間継続すると、培養液には大腸菌はもはや生存してなく、バクテリオファージの培養液が得られる。この培養液を常法に従って精製して、大腸菌の残査などを遠心分離などの常法に従って除去してバクテリオファージの培養液を得ることができる。

また、この発明に係るバクテリオファージは、例えば、ポリペプトン、イーストエキストラクトなどを含む寒天培地を用いても培養することができる。この場合には、濃度の異なる二重寒天培地を用いて、その上層寒天培地に、大腸菌とファージを添加して、室温もしくは加温した温度で培養することによっても培養することができる。このようにして培養されたファージは、例えば、その寒天培地を上記ファージ保存液などに添加して溶解し、その混合液を遠心分離などによって培養残査などの固形物と分離して上清を得、この上清液を原液として使用することもできる。

つまり、大腸菌の表面にはバクテリオファージが吸着するレセプター構造があり、バクテリオファージは、このレセプター構造を介してその大腸菌に吸着しそのバクテリオファージ自体の遺伝子である DNA や RNA など大腸菌の菌体内に注入する。かかる DNA や RNA などが菌体内に注入されると、バクテリオファージは短時間の内に大腸菌を食菌して菌体内で増殖する。バクテリオファージが菌体内で増殖すると、大腸菌は完全に破壊され、その結果バクテリオファージが培養液中に増殖して、バクテリオファージの培養液となる。このメカニズムは、バクテリオファージを含むこの発明のバイオ殺菌材料を使用して病原性細菌を殺菌する場合も同じであるといえる。

なお、このバクテリオファージの培養法において、大腸菌として腸管出血性大腸菌などの病原性大腸菌を宿主としてバクテリオファージの培養する場合には、その

大腸菌を培養する培地にマグネシウム、マンガン、カルシウムなどの微量の金属を添加するのがよく、その培地中に特にカルシウムイオンを存在させる必要がある場合もある。使用する薬剤としては、大腸菌などを培養する培地においてカルシウムイオンを放出するものであって、培養する大腸菌やバクテリオファージに対して悪影響を及ぼさないものであればいずれも添加することができ、かかる薬剤としては、例えば、塩化カルシウムなどが挙げられる。

#### (ファージ保存液の安定化)

前述のようにして培養されたこの発明に係るバクテリオファージを長期間安定して保存するためには、その培養液に塩類を含む緩衝液と、Mg、Mn、Ca などの微量の金属とを添加することもできる。更に安定化を高めるために、グリセロールを 0.001-5%程度、好ましくは 0.1%-1%程度に添加することもできる。更にまた、糖類、例えばマルトース、グルコースなどの多糖類、グリシン、アルギニン、リジンなどのアミノ酸、エチルパラベン、ポリリジンなどを添加することもできる。

この発明にかかる新規ファージ保存液は、それに含まれるバクテリオファージを、食品に対する高い安全性を確保しながら、安定化させるためには、グリシン、アルギニン、リジン等のアミノ酸、好ましくはグリシンを使用するのがよい。この場合、アミノ酸は、10 mM ないし 1 M、好ましくは 50mM ないし 500mM 含む緩衝液を pH6-8、好ましくは pH6.5-7.5 に調製して、これに必要な応じて塩化ナトリウムを 5 %、好ましくは 0.03%-1%の範囲、塩化カルシウムを 10mM、好ましくは 0.1-1mM の範囲で添加することもできる。

前述したようなこの発明に係る新規ファージ保存液は、通常の水道水で約 100 倍まで希釈してもファージが失活せず、十分に強力な食菌破壊作用を発揮することができる。また、家庭用のアルカリ水や酸性水で希釈しても同様で、含まれているファージの失活は認められず、十分な食菌破壊作用が発揮される。

#### (新規バイオ殺菌材料)

この発明に係るバクテリオファージを用いる新規バイオ殺菌材料は、次のようにして調製することができる。

つまり、前述のようにして培養したバクテリオファージの培養液を、遠心分離などの常法によって培養残渣と分離して、その培養液をこの発明に係る新規バイオ殺菌材料の原液として調製する。この発明に係る新規バイオ殺菌食材において、バクテリオファージは、例えば、 $10^2$ 個/ml ないし  $10^{12}$  個/ml、好ましくは  $10^3$  個/ml ないし  $10^8$  個/ml の範囲内のいずれの濃度であればよい。

また、この発明に係る新規バイオ殺菌材料には、かかるバクテリオファージを、単独でも、または、2種以上を組み合わせたカクテルで含有させることも可能であって、この発明に係る新規バイオ殺菌材料の使用の目的に合わせて適宜その組み合わせを変えて使用することもできる。この場合には、当然のことながら、組み合わせたバクテリオファージのカクテルのそれぞれの宿主となる病原性細菌を同時に食菌破壊することができる。

このようにして得られた新規バイオ殺菌材料の原液は、そのファージの濃度が通常は高すぎるので、その原液を適当な割合に希釈して使用する。この場合には、前述したファージ保存液にて希釈するのが好ましいが、水道水などによっても希釈することができる。

また、この発明において、異なった性質を有する2種類以上のバクテリオファージのカクテルとして用いることによって、高頻度使用による耐性菌の出現を抑制することもできる。たとえば、この発明において病原性大腸菌の殺菌において高頻度使用時の耐性菌出現を抑制するためには、例えば、T2 ファージと $\lambda$ ファージを等量混ぜたカクテルを殺菌材料として用いた場合には、それぞれの耐性菌出現頻度は  $10^{-6}$  であるのに対して、上記のカクテルを使用した場合の耐性菌出現頻度は  $10^{-12}$  となり、耐性菌の出現を理論的にも実験的にもほぼ皆無にすることが可能になる。

また、この発明に係る新規バイオ殺菌材料の安定化のために、食品用の殺菌剤、例えば安息香酸等を0.002%-2%程度、好ましくは0.1%-0.3%程度で添加することもできる。

更に、この発明に係る新規バイオ殺菌材料は臭いも味もないので、食材と共に用いる場合には、レモン等のフレーバーを添加してもよい。

この発明に係る殺菌材料の作用メカニズムについて病原性大腸菌を例に挙げて説明すると、バクテリオファージを培養する場合に、そのファージが大腸菌を食菌しながら増殖するときのメカニズムと同じである。

つまり、大腸菌の表面にはバクテリオファージが吸着するレセプター構造があり、ここを介してバクテリオファージは菌に吸着し自体の遺伝子である DNA や RNA など大腸菌の菌体内に注入する。かかる DNA や RNA などが菌体内に注入されると、バクテリオファージは短時間の内に大腸菌を食菌して菌体内で増殖する。このようにバクテリオファージが菌体内で増殖すると、大腸菌は完全に破壊され、その結果殺菌される。従つて、この発明に係る殺菌材料は、従来慣用されている他の殺菌剤とは作用メカニズムが全く異なっている。

この発明に使用するバクテリオファージは、空気中では比較的強いが、大腸菌のように細胞膜を有していないために胃酸等には弱く、経口で体内に入った場合には胃液中で失活し、続いて消化吸収されてしまう。従つて、そのバクテリオファージを含んだこの発明に係る殺菌剤は、従来の殺菌剤とは異なり、むしろ食菌作用に起因する殺菌作用を有する殺菌材料ないし殺菌食材と言えるものである。この性質に基づいて、この発明に係る殺菌材料をバクテリオファージを含む新規バイオ殺菌材料と名付けた。

この発明の新規バイオ殺菌材料は、前記作用メカニズムによる殺菌作用であるため、食菌し増殖してしまうのであるから濃度のムラの影響がなく、たとえ 1 匹でも病原細菌に吸着できればあとは時間とともに食菌によって殺菌してしまうことができる。従つて、物質濃度としては極めて低濃度で利用できるという利点もある。

(バクテリオファージ検出用試薬ならびにその試薬キット)

この発明に係るバクテリオファージは、その宿主となる病原性細菌を検出するための試薬として利用することができる。このファージは、その宿主となる病原性細菌を食菌して破壊してしまふことができるので、このファージの食菌作用を利用してその宿主となる病原性細菌を検出するための試薬を調製することができる。このファージを使用した試薬キットとしては、種々の形式のものがあるが、例えば、ファージを培養することができる寒天培地を、例えば、シャーレなどの容器に注入し

た形式などの試薬キットを挙げることができる。この形式の試薬キットを使用する場合には、その寒天培地の表面に、検出する病原性細菌が存在するかも知れない検体を含む試料を塗布して、適当な温度で培養をすると、寒天培地に含まれたファージがその宿主となる病原性細菌が存在している場合には、そのファージを食菌することになる。この食菌された跡が培地が溶菌されて透明もしくは半透明などの透けた状態になる。寒天培地がこのような状態になった場合には、調べた検体には寒天培地に検出用試薬として含めたファージに対応する病原性細菌が存在することになり、該当する病原性細菌が検出されたことになる。

例えば、検出すべき病原性細菌が病原性大腸菌の場合には、その大腸菌は分裂して増殖する時間が極めて短いので、検査する検体にかかる大腸菌が存在している場合には、例えば、その検体を上記検出用試薬キットとなる寒天培地に塗布して30分程度経過すれば、検出する大腸菌が存在するかどうかの判定をすることができることになる。つまり、この発明に係るファージを利用すれば、例えば、大腸菌を検出する場合には、30分程度という短い時間で検出することができ、極めて便利である。また、この検出用試薬またはその試薬キットを使用すれば、検査する試料中に検出すべき病原性細菌が極めて僅かした存在してなくとも、ファージの食菌作用を利用することから、確実に検出することができることになり、極めて有用である。

なお、かかる検出用試薬またはその試薬キットとして、2種もしくはそれ以上の異なる性質を有するファージを使用することにより、異なる種類の病原性細菌を同時に検出することもでき極めて有益で便利である。

したがって、この発明に係る病原性細菌検出用試薬またはその試薬キットは、ファージを含有させた寒天培地を入れたシャーレなどに、検査する検体を接触させて、病原性細菌が増殖できる程度の温度の適当な場所に放置するだけで、その病原性細菌の有無が判定できるので、その他の検出用測定器具や装置は一切不要であるので、その使用方法が極めて簡単である。したがって、この発明に係る病原性細菌検出用試薬およびその試薬キットは、例えば、病原性細菌を検出するための一次スクリーニングに簡単に利用することができる。



この発明に係る新規バイオ殺菌材料はまた種々の使用方法で適用することができる。この発明に係る新規バイオ殺菌材料は、病原性細菌が存在しうる場所や、病原性細菌が感染しうる物品などのあらゆるものに対して使用することができ、それらの物品などが病原性細菌で感染するのを防御したり、または、かかる病原性細菌で汚染されていないかなどを検査することなどができる。

つまり、この発明に係る新規バイオ殺菌材料は、例えば、生鮮食品などの食料品に噴霧したり、その食料品をその中に浸漬させたりもしくはそれで洗浄したりなどして直接使用することができる。したがって、この新規バイオ殺菌材料は、生鮮食品などの食料品などの保存、調理などのいかなる段階においても、その食料品などが病原性細菌によって汚染されないように使用することができる。

また、この発明に係る新規バイオ殺菌材料は、例えば、調理場、台所、保存庫などや、病院などの清潔を保持すべき場所や、エプロン、白衣などの衣服などの清潔にしておかなければならない物品などに直接噴霧するなどして、その場所や物品などが病原性細菌によって汚染されるのを予防することができる。更に、手などの身体を介して病原性細菌が体内に入ったりもしくは他人に感染させることなどを防止するために、この新規バイオ殺菌材料を洗浄液として使用することもできる。

更にまた、この新規バイオ殺菌材料は、例えば、生鮮食品などの栽培または生産過程において使用することができる。例えば、生鮮食品などの食料品にスプレーしたり、カイワレ大根などの栽培野菜の栽培用培地に混合して添加したり、カイワレ大根などの栽培野菜にスプレーしたり、または特に水耕栽培においてはその水の中に所定濃度を入れるなどして使用することができる。

この新規バイオ殺菌材料はまた、例えば、魚市場や、肉加工場などの生鮮食品が処理などされる場所や、牛舎などの家畜などの飼育場などにおいても殺菌の目的で使用する事ができる。

以下に、この発明を実施例によって更に詳細に説明する。しかし、これらの実施例はこの発明を例示的に説明する目的のためだけに記載するのであって、この発明をいかなる意味においても限定するものではなく、この発明の範囲ならびに精神に含まれるあらゆる変形や変更はすべてこの発明の範囲内に包含されるものと解釈

すべきである。

## 実施例

### (実施例 1)

#### バクテリオファージのスクリーニング

ハト、カラス、ウシ、イヌ、ネコ、家禽などの動物の糞や、下水よりサンプルを収集した。各サンプルの約 1 g また下水の場合は 5 ないし 10 ml を LB 培養液に溶解して、遠心分離によって残渣を沈殿させ、上清液を得た。この上清液にまず少数存在すると推定されるファージを、大腸菌 K 株、B 株および C 株で制限酵素マイナス (r<sup>-</sup>) で修飾酵素ポジティブ (m<sup>+</sup>) の宿主に感染させてファージを増幅した。この溶菌液を O157 にプレートして、単一プラークを分離した。その後数段の増幅を行って高タイターストックを得た。このうち、ほぼ完全に溶菌したクリアなプラークだけを選択して、次の段階として、高温 (55℃-65℃) で 5-10 mM の EDTA に数時間接触させて自然に存在する欠失 DNA を含むファージだけを選択した。この操作を数回繰り返すことによって、安定で必須遺伝子のみを有するファージを選択することができた。

このようにしてスクリーニングして数多くのファージを分離した。これらのファージについて、複数種類の腸管出血性 O157 に対する作用を調べた結果、その作用が強いファージを 4 種類ほど選択してそれらをバクテリオファージ # 1、# 2、# 3 および # 4 と同定した。これらのファージについて DNA 配列を下記のようにして決定した。

### (実施例 2)

#### バクテリオファージの調製法

大腸菌をポリペプトン、イースト抽出物等を含む大腸菌用培地(エループロス)を用いて 1 リットルのジャーファーマンターで培養し、吸光度 = 0.2 (大腸菌菌体数  $2-3 \times 10^8$ /ml) になった段階で、実施例 1 でスクリーニングして得た病原性大腸菌 O157 のみを特異的に破壊するファージをモイ 20 (MOI = 20) になるように添加して(特願平 8-261132)、37℃で 4 時間以上培養した。培養液がやや透明になったところでクロロフォルムを数滴添加して、さらに 37℃で 10 分間培養した後、8,000

回転/分で30分間遠心分離をして上清を得た。得られた上清液を0.45ミクロンのミリポーフフィルターにて無菌ろ過を行い、病原性大腸菌O157のみを特異的に食菌破壊するファージを得、4℃で保存した。

(実施例3)

(新規ファージ保存液の調製)

(1)グリシンを15g、 $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ を0.5mM、NaClを0.5%、グリセロールを0.02%になるように添加して、NaOHでpH6.8-7.0に調整した。その後、純水で1,000mlにして、オートクレーブで121℃、15分間滅菌処理を行って新規ファージ保存液を調製した。

(2)グリシンを15g、NaClを0.5%、グリセロールを0.02%になるように添加した後、NaOHでpH6.8-7.0に調整し、純水で1,000mlにした後、オートクレーブで121℃、15分間滅菌処理を行って新規ファージ保存液を作成した。

(3)グリシンを15g、 $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ を0.5mM、グリセロールを0.02%になるように添加して、NaOHでpH6.8-7.0に調製した後、純水で1,000mlにした。その後、オートクレーブで121℃、15分間滅菌処理を行って新規ファージ保存液を作成した。

(4)グリシンを15g、 $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ を0.5mM、NaClを0.5%になるように添加して、NaOHでpH6.8-7.0に調製した後、純水で1,000mlにした。その後、オートクレーブで121℃、15分間滅菌処理を行って新規ファージ保存液を作成した。

(5) $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ を0.5mM、NaClを0.5%、グリセロールを0.02%になるように添加して、NaOHでpH6.8-7.0に調製した後、純水で1,000mlにした。その後、オートクレーブで121℃、15分間滅菌処理を行って新規ファージ保存液を作成した。

(6)グリシンを7.5g、 $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ を0.5mM、NaClを0.5%、グリセロールを0.02%になるように添加して、NaOHでpH6.8-7.0に調整した。その後、純水で1,000mlにして、オートクレーブで121℃、15分間滅菌処理を行って新規ファージ保存液を調製した。

(7)アルギニン 0.2M、 $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  を 0.5mM、NaCl を 0.5%、グリセロールを 0.02%になるように添加して、NaOH で pH6.8-7.0 に調整した。その後、純水で 1,000ml にして、オートクレーブで 121℃、15 分間滅菌処理を行って新規ファージ保存液を調製した。

(8)リジン 0.2M、 $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  を 0.5mM、NaCl を 0.5%、グリセロールを 0.02%になるように添加して、NaOH で pH6.8-7.0 に調整した。その後、純水で 1,000ml にして、オートクレーブで 121℃、15 分間滅菌処理を行って新規ファージ保存液を調製した。

#### (実施例 4)

##### 新規バイオ殺菌材料の調製法

上記実施例 1 で調製したバクテリオファージは、宿主大腸菌を用いて公知の方法で増殖し、各ステップで約 100 倍の増加を計った。すなわち、対数増殖期に達した大腸菌に MOI (Multiplicity of Infection) 10 でバクテリオファージを感染させ、約 100 分後に溶菌したところでクロロホルムを加えた。次いで、菌の残骸(DNA、RNA、タンパク質、細胞膜等)を遠心分離によって除去して、バクテリオファージ粗製品を調製した。得られた粗製品は約  $10^9/\text{ml}$  の感染力を有していた。

得られたバクテリオファージ標品にグリセロールを 0.1-0.01%、ラウロイルサルコシン塩、安息香酸塩などの塩類等の安定剤を加えるとともに、金属として Mg、Mn あるいは Ca を添加して新規バイオ殺菌材料を調製した。この殺菌材料を低温室( $4 \pm 1^\circ\text{C}$ )で保存したところ、バクテリオファージのタイターは 6 ヶ月間失活することなく安定に保存できた。なお、新規バイオ殺菌材料の調製に当たっては、バクテリオファージは基本的に 2 種類の異なる種を用いて残存細菌の出現が無いように調製した。例えば、T2 ファージと  $\lambda$  ファージを用いた場合、耐性菌の出現頻度は、 $10^{-6} \times 10^{-6} = 10^{-12}$  となり理論的にも実験的にも全く問題ではなくなった。これにより、本実施例のバイオ殺菌材料を使用することによって、病原性大腸菌を含む有害細菌も完全に駆除できた。また、これによって高頻度使用による除菌効果の低下も皆無とすることができた。

### (実施例 5)

#### 新規バイオ殺菌材料の調製法

バクテリオファージは、宿主大腸菌を用いて公知の方法で増殖し、各ステップで約 100 倍の増加を計った。すなわち、対数増殖期に達した大腸菌に MOI (Multiplicity of Infection)10 でバクテリオファージを感染させ、約 100 分後に溶菌したところでクロロホルムを加えた。次いで、菌の残骸(DNA、RNA、タンパク質、細胞膜等)を遠心分離によって除き、上清のバクテリオファージを精製した。精製はポリエチレングリコールによる沈澱法と CsCl による密度勾配遠心法によって行い、約  $10^{12}$ /ml の感染力のある標品を得た。

得られたバクテリオファージ標品にを 0.1-0.01%、ラウロイルサルコシン塩、安息香酸塩などの塩類等の安定剤を加えるとともに、金属として Mg、Mn あるいは Ca を添加して新規バイオ殺菌材料を調製した。この殺菌材料を低温室( $4 \pm 1^\circ\text{C}$ )で保存したところ、バクテリオファージのタイターは 6 ヶ月間失活することなく安定に保存できた。なお、バイオ殺菌材料の調製に際しては、実施例 1 の場合と同様にして調製した。その結果、実施例 1 の場合と同様の作用効果が得られた。

なお、使用の目的によって細菌に対してバクテリオファージが MOI: 10 になるように濃度を調製して用いた。これらの操作および保存は原則として低温室( $4^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ )で行った。

### (実施例 6)

#### 新規バイオ殺菌材料の調製法

大腸菌を、ポリペプトン 10 g、イーストエキストラクト 3 g、NaCl 2.5 g の組成からなる L-ブロス培地に添加して、ジャーファーメンター中で  $37^\circ\text{C}$  で培養した。分光光度計で OD=0.2 になった段階で、バクテリオファージを添加した(MOI: 20)。なお、この段階での大腸菌の菌体数は約  $2-3 \times 10^8$ /ml であった。

バクテリオファージを添加した後、通気をしながらジャーファーメンター中で  $37^\circ\text{C}$  で 4 時間培養して、培養液がやや透明になった段階でクロロホルムを数滴滴下した。その後、8,000 rpm で 30 分間遠心分離をして残査を除去し、上清を得た。この上清液を原液として殺菌材料の調製に使用した。

## (実施例7)

## (1) 病原性大腸菌の検出用キット

下記組成を有する10%寒天培地を45℃に加温して完全に溶解して下層培地としてシャーレ上に均一に注入して室温に放置して固化させた。

- 10% ポリペプトン
- 3% イーストエキストラクト
- 2.5% NaCl
- 0.1% グルコース
- 5 Mm  $\text{CaCl}_2$

この10%寒天下層培地の表面に、別に調製した同一組成を有する5%寒天培地3mlをE. coli O157:H7 菌株（菌体数： $4 \times 10^7/0.2 \text{ ml}$ ）を含有させた溶液0.1mlに添加して、この混合物を45℃に加温して完全に溶解して上層培地として均一に注入して室温に放置し固化させて二重寒天培地を調製した。

この二重寒天培地の表面にファージを含む溶液0.1mlをすじ状に塗って、37℃で7時間培養して、腸管出血性大腸菌 E. coli O157:H7 を生育させて、ファージの食菌作用による穴（プラーク）の数を数えてそれによりファージ数を算出した。この結果、検査用サンプルに目的とするファージが存在している場合には、寒天培地にファージ数に応じてプラークが生成され、目的とするファージが検出された。

## (2) 病原性大腸菌の検出用キット

下記組成を有する寒天培地を調製した。

- 10% ポリペプトン
- 3% イーストエキストラクト
- 2.5% NaCl
- 0.1% グルコース
- 5 Mm  $\text{CaCl}_2$

腸管出血性大腸菌 E. coli O157:H7 菌株（菌体数： $4 \times 10^7/0.2 \text{ ml}$ ）と各濃度のファージとを混合した溶液0.1mlに、別に調製した同一組成を有する5%寒

天培地 3 ml を添加して、この混合物を 45℃ に加温して完全に溶解して上層培地として均一に注入して、直ちに 37℃ で 7 時間培養して、腸管出血性大腸菌 *E. coli* O157:H7 を生育させて、ファージの食菌作用による菌体の発育阻止率を観察した。また、低濃度のファージを接種した場合は、ファージの食菌作用による穴（プラーク）の数を数えてそれによりファージ数を算出した。

上記の結果、腸管出血性大腸菌 *E. coli* O157:H7 に対して、それに特異的なファージの食菌作用を利用して該大腸菌を検出することができた。また、この方法でファージ数（力価）の検定も可能である。

上記で得られた結果を下表に示すが、この場合の原液の力価は  $4.0 \times 10^{10}$  /ml であった。

ファージ液希釈率	プラーク数 (シャーレ上)	力価（計算）* (ファージ数)
原液	全面溶解	計算不能
10 <sup>3</sup> 倍希釈	全面溶解	計算不能
10 <sup>7</sup> 倍希釈	全面溶解	計算不能
10 <sup>8</sup> 倍希釈	196	$3.92 \times 10^{10}$ /ml
10 <sup>9</sup> 倍希釈	21	$4.2 \times 10^{10}$ /ml
10 <sup>10</sup> 倍希釈	2	$4.0 \times 10^{10}$ /ml

\* 計算方法： プラーク数  $\times$  希釈率/0.1 ml

#### （ファージの力価検定法）

大腸菌の増殖が吸光度=0.2に達したものと、ファージの希釈検体とを混合して、上述したように寒天培地上に重層してファージの力価を検定した。

この発明に係るバクテリオファージならびにそれを用いたバイオ殺菌材料の効果について更に記載する。

#### （固体培地上での殺菌効果）

有害細菌である病原性細菌が固形物上に付着あるいは増殖した場合を考えて本殺菌材料の殺菌効果を見た。

図1に示したように、大腸菌を横に一行塗布した。この塗布前あるいは塗布後に実施例1で調製したバイオ殺菌材料を、 $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ と希釈した液を縦に塗付した(本方法はクロス・ストリーク法と呼称される)。一晩 37℃で培養後に、バクテリオファージに接触した菌は全て完全に溶菌された。また、コロニーの形成は全く観察されず本殺菌材料の強力な効果が示された。

#### (液体培地中での殺菌効果)

食品の液体中(汁、スープ)や水耕法によるもやしやカイワレ大根などの場合、食中毒の原因菌が増殖することが多い。このような場合は単位容積に対して菌濃度が低い時に本剤を与えることが効果的であるので、その効果を確認するために下記の実験を行った。

一般に使用される市販の水耕法用の培地到大腸菌を植え増殖を計るため 1/10 程度のブイヨン培地を加えた。数時間後に 37℃で培養を開始し本殺菌材料を添加したところ 12 時間後には菌は完全に死滅した。

なお、有害菌が増殖した場合でも、MOI:10-50 で本殺菌材料を使用したところ、増殖した有害菌を完全に駆除することができた。

#### (スプレーによる殺菌効果)

約1年間家庭で使用したまな板を用いて本剤の殺菌効果を調べた。まず大腸菌 1 万匹を約 10ml の培地(ブイヨン培地)に溶解し、この溶液をまな板の表裏にくまなく塗布して、30 分後に余分の水分を除いた。その後、このまな板を 2 等分し、一方を本剤を塗布して実験する実験用として、また別の一方を対照用として使用した。実験用まな板には本剤をスプレーで一面くまなく散布した。他方、対照用まな板には同量の水を散布した。一夜 37℃ 保存後、両まな板に付着している残存菌数をまな板を 500ml の培地で洗い菌数を計数して調べた。その結果、実験用まな板からは大腸菌は全く検出されなかったけれども、対照用まな板の方からは約 100 万-200 万匹の大腸菌が検出された。



(食肉に付着している大腸菌に対する効果)

ステーキ用の牛肉 10 枚を用い、10 枚に平均約 100 個のコロニーが出る数の大腸菌を散布した。これらを実験グループと対照グループの 2 つのグループに分け、実験グループには本剤を含むスプレーをくまなく散布し、対照グループには散布しなかった。37℃で 12 時間置いた後、このステーキの一部をランダムに切りとり(約 10 切れ)、寒天培地にレプリカした後、さらに一晚培養し、両サンプルに生じたコロニー数を算定した。その結果、本剤を散布した実験グループのステーキには発生したコロニーはゼロであったのに対し、本剤をスプレーしなかった対照グループのステーキでは  $100 \pm 10$  個のコロニーが見出された。この結果はこの発明に係る殺菌剤が優れた殺菌効果を呈することが示された。

(バクテリオファージの塩基配列決定法)

この発明に係るバクテリオファージのうち、上記スクリーニングによって単離したバクテリオファージ # 1、# 2、# 3 および # 4 のそれぞれの DNA の塩基配列は常法に従って定めた。

#### (1) バクテリオファージの増殖

L-液体培地に大腸菌 N60 に感染させ、分光光度計で OD0.2 まで培養して、MOI を理論的に 10 になるようにバクテリオファージを加え、30 分間氷上放置した後、約 20 時間、37℃で振とうした。その後、クロロホルムを 1 滴加え、5 分間振とうした。その培養液を、4,500rpm、4℃、20 分間の条件で遠心して、上清みだけを滅菌済みのボトルに移し、L-寒天培地に撒いて、濃度測定を行った。その結果、 $1 \times 10^{10}$ /ml の濃度のバクテリオファージ 500 ml を得た。

#### (2) バクテリオファージの濃縮

上記で得られたファージ培養液に、20%PEG・2M NaCl を加え、氷上で 1 時間放置した。12,000 rpm、4℃、20 分間の条件で遠心をして、水分を良くきり、沈澱に 1 ml の SM 溶液を加え、よく懸濁して、マイクロ遠心管に移した。濃度を確認するために、L-寒天培地に撒いて濃度測定を行った結果、 $1.3 \times 10^{20}$ /ml となった。

### (3) ファージ DNA の調製

濃縮培養液に、10% SDS 0.5M EDTA をそれぞれ 0.1 %、5mM になるように加え、(各 1/100 量)、68℃、15 分間加熱した。フェノールで抽出し、次いでフェノール・クロロホルムで抽出した後、再度クロロホルムで抽出した。得られた水層に等量のイソプロパノールを添加して、-70℃に冷却して 10 分間放置した。その後、15,000rpm、4℃、15 分間の条件で遠心をして、上清みを除去して、沈殿をエタノールで洗浄し、吸引乾燥して、1 ml の TE 溶液に溶解した。

### (4) 電気泳動で切断を確認

この DNA 水溶液 4  $\mu$ l に M バッファー 2  $\mu$ l、滅菌水 13  $\mu$ l、制限酵素 Hind III 1  $\mu$ l を加え、1 時間、37℃で振とうした。1/10 量の試料重層用試薬を加え、0.7% アガロースゲルで 100 V、2 時間の条件で電気泳動を行った。400 ml の TAE 溶液に 20  $\mu$ l のエチジウムブロマイドを溶解した溶液中にアガロースゲルを 2 時間放置した後、UV ランプによりバンドを確認した。

### (5) ベクタープラスミド DNA の脱リン酸化

次に、プラスミド (pkk223) 3  $\mu$ l、M バッファー 2  $\mu$ l、滅菌水 14  $\mu$ l、制限酵素 Hind III 1  $\mu$ l を加え、1 時間、37℃で振とうした。Hind III を失活させるため 70℃の湯浴中に 15 分間放置した。脱リン酸化を行うため、このベクター 18  $\mu$ l、バッファー 2  $\mu$ l、BAP 0.5  $\mu$ l、滅菌水 26.5  $\mu$ l を加え、2 時間、37℃で振とうした。その後、フェノール・クロロホルムで抽出を 2 回行い、エタノール沈殿を行って、TE 溶液 80  $\mu$ l に溶解した。ベクターの有無を確認するため、1/10 量の試料重層用試薬を加え、0.7% アガロースゲルで 100 V で 2 時間電気泳動を行った結果、ベクターの存在を確認した。

### (6) 酵素の失活

リガーゼ反応を行うため、ファージ DNA 水溶液 4  $\mu$ l に M バッファー 2  $\mu$ l、滅菌水 13  $\mu$ l、制限酵素 Hind III 1  $\mu$ l を加え、1 時間、37℃で振とうした後、Hind III を失活させるために 70℃の湯浴中に 15 分間放置した。

### (7) リガーゼ反応

このファージ DNA 水溶液と、上記において脱リン酸化を行ったベクターを 60 °C の湯浴中に 10 分間放置した。(1) Hind III で切断したファージ DNA、(2) Hind III で切断したファージ DNA と脱リン酸化を行ったベクター、(3) 脱リン酸化を行ったベクター、(4) Hind III で切断したベクターとして、それぞれ 10 x バッファー 10  $\mu$  l、DNA 水溶液 10  $\mu$  l、滅菌水を全量が 100  $\mu$  l になるように加え、さらに E. coli DNA ligase 2  $\mu$  l を加え、16 °C で一晩放置した。

#### (8) 形質転換

competent Cell (HB101) 50  $\mu$  l に、上記(1)、(2)、(3)、(4)のそれぞれに 5  $\mu$  l を加え、30 分間氷上に放置し、次いで 42 °C で 45 秒間放置し、更に 2 分間氷上に放置した。次いで、L-液体培地を 0.5 ml になるように加え、1 時間、37 °C で振とうした後、アンピシリンを加えた L-寒天培地に撒いた。

#### (9) 組換え体クローンの培養

上記(2)のコロニーをアンピシリンを加えた L-液体培地 500 ml にとり、約 24 時間培養を行った。その培養液を 6,000 rpm、4 °C、15 分間の条件で遠心をして、得られた上澄みを除去した。

#### (10) プラスミド精製

プラスミド精製キット (フナコシ製) を用いてファージ DNA の入っているプラスミドを精製した。まず、ペレットに P1 を 10 ml、P2 を 10 ml 加え、ゆっくり攪拌した。5 分間室温で放置した後、冷やした P3 を 10 ml 加えゆっくり攪拌した後、20 分間氷上に放置した。その後、20,000 g、4 °C、30 分間の条件で遠心をして、上澄みを取り、この上澄みだけを更に 20,000 g、4 °C、30 分間の条件で遠心をした。カラムに QBT を 10 ml 添加して洗浄した。このカラムに上澄みを加え、QC 30 ml で 2 回洗浄した。その後、QF 15 ml で精製して、この精製液に 0.7 volume のイソプロパノールを加えた。この混合液を 15,000 g、4 °C、30 分間の条件で遠心をして、得られた沈澱を 70% エタノールで洗浄して、5 分間乾燥し 1 ml の滅菌水に溶解した。このプラスミドを Hind III で切断して、電気泳動を行った。

このようにして得られたフラグメントを常法に従って塩基配列の解析を行った結果、この発明に係るバクテリオファージ# 1、# 2、# 3および# 4は、それぞれ下記の配列番号 1-1 ないし 1-4、配列番号 2-1 ないし 2-10、配列番号 3-1 ないし 3-5 および配列番号 4-1 ないし 4-5 に示すような部分配列を持つフラグメントを含有するDNAをそれぞれ有していることが確認された。

### 産業上の利用可能性

この発明によってある特定の種類の病原性細菌に対して高い特異性を有するバクテリオファージが提供されることによって、そのバクテリオファージを利用して、生鮮食品などの食料品など、それら食料品などを保存、調理、処理する場所、器具など、またそれら食料品などを取り扱うヒトなどがその病原性細菌に感染するのを確実に予防などすることができ、幅広い用途に簡単に使用でき、極めて有用である。また、この発明に係るファージを使用すると、感染した場所は勿論のこと、感染したと予想される場所や物品などをも消毒などすることによって、感染原因菌の殺菌を簡単に、確実に、その上短時間に行うことができ極めて有用である。同時に、かかるファージを使用することによって、その宿主となる病原性細菌を容易に、確実に、かつ、極めて短時間に検出できることになり、感染の有無、感染源の特定などが短時間にできることになり、その感染予防や治療を迅速に行うことができるという大きな利点がある。

また、この発明によってある特定の種類の病原性細菌のうち、腸管出血性大腸菌などの病原性大腸菌に対して高い特異性を有するバクテリオファージが提供されることによって、生鮮食品などの食料品など、それら食料品などを保存、調理、処理する場所、器具など、またそれら食料品などを取り扱うヒトなどが、特に腸管出血性大腸菌などの病原性大腸菌に感染するのを確実に予防などすることができると共に、万一感染した場合もしくは感染したと予想される場合でも、被感染物品や場所などもしくは感染が疑われる物品や場所などを消毒することによって、その病原性大腸菌を確実に、簡単にかつ短時間で殺菌することができ、極めて有用である。また、このファージによって対応する病原性大腸菌を短時間のうちに、かつ、確実に

に検出できるので、感染の有無や感染源の特定などが極めて簡単に、短時間に、かつ、確実にでき極めて有用である。

更に、この発明によって新規なバクテリオファージが提供されることによって、その宿主となる病原性細菌の種類が増加することになり、より多き種類の病原性細菌に対して対処できるようになり、感染予防、治療の面で幅広い対応ができるようになった。

前述したような特定の病原性細菌、特に病原性大腸菌に対して高い特異性を有するバクテリオファージは単独で使用する事ができるのは当然のことであるが、その性質の異なるファージを 2 種類以上混合したカクテルを使用することによって、他種類の病原性細菌に対して同時に対応できることになり極めて便利でありかつ有利である。

この発明はまたかかる新規なバクテリオファージのスクリーニング法を提供している。このにスクリーニング法によって、病原性細菌に対して特異性の極めて高い新規なファージを確実に、簡単にスクリーニングすることができるという効果がある。

この発明がかかる新規なバクテリオファージが含まれた新規なバイオ殺菌材料を提供することによって、前述したような、このファージが提供されることによって達成される効果が実用化できることになる。つまり、かかるファージをこの新規なバイオ殺菌材料に含有させることによって、例えば、生鮮食品などの食料品など、それら食料品などを保存、調理、処理する場所、器具など、またそれら食料品などを取り扱うヒトなどに使用することができ、特に腸管出血性大腸菌などの病原性大腸菌を含む病原性細菌に感染するのを確実に予防などすることができると共に、万一感染した場合もしくは感染したと予想される場合でも、被感染物品や場所などもしくは感染が疑われる物品や場所などを消毒することによって、その病原性細菌を確実に、簡単にかつ短時間で殺菌することができるという大きな効果がある。

この新規なバイオ殺菌材料にこの発明に係る保存剤もしくは安定化剤を加えることにより、かかる新規バイオ殺菌材料を、そのファージの作用を保持させながら、安定して長期間保存することができ有用である。

また、かかる新規なバイオ殺菌材料にこの発明に係る新規なバクテリオファージを複数種類含有させることによって、このバイオ殺菌材料によって複数の種類の病原性細菌に対して同時に対処できるという大きな効果がある。

この発明によってかかる新規なバクテリオファージを製造する方法が提供されることによって、そのファージを大量にかつ低コストで製造することができることになり、特に、この発明によってかかる新規なバクテリオファージが含まれた新規なバイオ殺菌材料を実用化することにおいて極めて有利である。

また、この製造方法において、そのファージを培養する培地にカルシウムイオンなどの金属イオンを添加することによって、かかる金属イオンを要求するファージの生育を促進して、ファージの増殖を早める効果がある。

また、この発明によってかかる新規なバクテリオファージを安定して保存することを可能にする安定化剤もしくは保存剤が提供されることによって、このファージを安定して長期間保存することができることになり、このファージ安定液を加えて調製されるこの発明に係る新規なバクテリオファージも同様に安定して長期間保存ができるという大きな効果がある。

更に、この発明が病原性細菌検出方法およびその検出用試薬キットを提供することによって、この発明に係るファージを利用して、その宿主となる病原性細菌を簡単に、短時間でかつ確実に検出することができ極めて有用である。この検出方法ならびにその検出用試薬キットを使用すれば、病原性細菌による感染が疑われる場合など緊急の対応が必要な場合でも、検体を採取したその現場においてその検体に疑義病原性細菌が存在するかどうかをその検出用試薬キットだけを使用して、つまり、その他の検出のための測定機器などは一切使用せずに、短時間のうちに確実に検定することができるという大きな利点がある。更に、この病原性細菌検出方法は、たとえ検体の量が非常に少なくとも、その検体中に1個でも検出すべき病原性細菌が存在していれば、その細菌の増殖によって、それを宿主として食菌するファージが作用するので、その細菌を検出できる極めて感度の高い方法である。

また、この病原性細菌検出方法を使用する病原性細菌検出試薬キットも、例えばファージを含んだ寒天培地を入れたシャーレなどの通常の容器だけという極めて

簡単な構成でよく、検出に際してはこのキットを細菌が増殖しやすい環境下に、しかも短時間、つまりファージがその細菌を食菌する時間だけ放置するだけでよく、その他の測定機器など一切不要であることも大きな効果である。

## 配列表

配列番号： 1-1

配列の長さ： 628

配列の型： 核酸

鎖の数： 2本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： Genomic DNA

配列の起源： ファージ

## 配列

TCATCATCCC	ATACTTCTTC	AGTACTATAT	TCAGCACTGT	GAAGTTGGTG	50
TTCAGGAATG	AAATCAGGAA	TTTGCATTTC	ACGTTCTTTT	TCTTGGATTA	100
GTTCTTCACG	GGTTTTAATG	ACCGTACCAC	CTGAACCAAT	CTTATCACCA	150
CGAGCATTTA	GGTTTGCAAT	ACCTAGTGCT	ACTTGGTGCT	GGTTTTGATA	200
CTTTAGCATA	TCCATATCAA	TTGTTGTTCC	ACGATAAGTT	GTGTGTTTTG	250
ACATATAAAA	ATCCTTTTTT	TATGTGAGTG	ATATAACGCC	TCAAACAACA	300
TTATATCACA	TGTTTTTCTA	CCATTTCAAA	AATTCATTTA	CATCTAGTTT	350
ATACTTCAAA	GAATCAACCA	TATGCAAATC	AATCAGGAAC	AAACAATACG	400
AAGCCACTGA	ACTACCACGC	CCAAGACCCC	AAAAAATATT	GTGCTCTTCC	450
ATATAATCAA	CTAACCAGAT	CATACATCTT	AAAAGCTTGG	CTGTTTTGGC	500
GGATGAGAGA	AGATTTTCAG	CCTGATACAG	ATTAAATCAG	AACGCAGAAG	550
CGGTCTGATA	AAACAGAATT	TGCCTGGCGG	CAGTAGCGCG	GTGGTCCCAC	600
CTGACCCCAT	GCCGAACTCA	GAAGTGAA			628

配列番号： 1-2

配列の長さ： 780

配列の型： 核酸

鎖の数： 2本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： Genomic DNA

配列の起源： ファージ

## 配列



```

TTCAGTTAAA CAATATTGTG AGACTACGTG CTGCTGGTAT TGAAGATGCA 50
CGTTTAGAAT AACTATCCAT AAGGNCGCAT TACGCGTCTT TTTCTATGCG 100
AGAATAAAAT GACAAAATTA GATGAGTTCC TATCAAACGT ATCAGTACTA 150
GACACCGAAA CAACTGGTGT CGAAAGTGAA GATGATATTA TTGAATTTAG 200
TATTTTCATAT CCTCACGATG CACATGAGAA TATTGATACT ATTGATAACT 250
ACACTTTGCG TTATAAACCA CTAAAAGATA TACCACCAGA AGCAAGTGCT 300
GTGCATTTTA TCAGTACTGA AGATGTAGCA AACTGCATTG GTTATAAAGA 350
TGACTTAGAA AACATTGACG CACTAATGGG GTGTCGTAAT TATTTTATTG 400
GACACAACGT TCAATTTGAC CGCCGAATGA TGGTAGATAA CGAATATAAA 450
TATCGTAACT CAGTTTCGCA GTACTTGCTC GATGAAGATA AATGGATTTG 500
TACCCTTTCGT TTAGCTAAGA AGATGTTTGC AGAAGACACT GAATTTAAAA 550
ACTTAACTCT AAGTTATTTG TGGTATAAAT TTGGTTGCTA TCGTGATGTA 600
CATCGTGCAG TCAATGCTCA CGCAGCAAAA GATGACGTGT TTATGTGTTA 650
TCAAGTTCTA ATCAAATTGA TTGAAGTTGC GATTGAACGT GGACATATTG 700
ACCCTAATGG TGACATTGGT GAACAAATCG TAACATTCTG TAATACACCA 750
ATGCGTTATA AATTCATGCC ATTTGGTAAA 780

```

配列番号 : 1-3

配列の長さ : 518

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 2本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : Genomic DNA

配列の起源 : ファージ

配列

```

AAAGATAGTG GATGTATTAT TCTCGAAAAT GGTTCTGACG TTGTTACTGA 50
TGACTTCAGT GTAGCGTTTG ATGTTTCACC TGATGGTTCG CTATCAATGC 100
CACGCTTAGG GACTGGTGAC ATGACTGTGT GGGTAGGTTT CACTATGGGG 150
AATGTACCAG GCACGGTGTA TGTAGATGAT GCTGAGTTGA AAGAAAGCTT 200
GGCTGTTTTG GCGGATGAGA GAAGATTTTC AGCCTGATAC AGATTAAATC 250
AGAACGCAGA AGCGGTCTGA TAAAACAGAA TTGCCTGGC GGCAGTAGCG 300
CGGTGGTCCC ACCTGACCCC ATGCCGAAC CAGAAGTGAA AGNCCGTAGC 350
GCCGATGGTA GTGTGGGGTC TCCCCATGCG AGAGTAGGGA ACTGCCAGGC 400
ATCAAATAAA ACGAAAGGCT CAGTCGAAAG ACTGAGCCTT TCGTTTTATC 450

```

TGTTGTTTGT CGGTGAACGC TCTCCTGAGT AGGACAAATC CGCCGGGAGC 500  
 GGATTTGAAC GTTGCGAA 518

配列番号 : 1-4

配列の長さ : 599

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 2本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : Genomic DNA

配列の起源 : ファージ

#### 配列

AAGCTTCAAC AAGTTCTTTA AATGGAACCA TTGGAGCTTC TTTCTTATCT 50  
 TTATCAGTCA GGCTTGACAG CATCTGTGCA AATGTTGGAA CAAAAATTTT 100  
 ACCCAACTTC ATAGACATCT TAATACCATC TCTTGCCCCA AGCAGAACGA 150  
 TATTTACTTT CTTACCATTA ATTACTCTAG ATTCTGTTTT CATTGTGATT 200  
 CCTTAATACT TTTAAAGAAA CAAAAAGGG GAAGACCTTT TAAAGTCTCC 250  
 CCCTTATAGG ATTTATTAAA CACTTGACGC TGAATTGTA GAAGTGAGT 300  
 CTAAGTTCTC ACAACCAAAA ATCCAAGTTT TAGAGTTCTG GTCACGACCA 350  
 AGTTCAATCT GTGGTAATTC CTGCAACCAA GCATTAATAC CAGTTGCCAG 400  
 AACAGAGCCT GATGGGTCGT AGATTACGAA GTAGAAGAGA TATCTTCTTC 450  
 AAGTTCCATA TTGTCTTGTT TAGCTTGAAT TGCAGAAANN ANCTTGTTAN 500  
 GAGANAGAGN CTGGATTANN TCAATCTCAA TAAGACCTGG CNTTGCTCNA 550  
 TTTCTTTGCA NGGAACCTGG CCACCTTNAC CTACAACTGG GNGCACAAT 599

配列番号 : 2-1

配列の長さ : 585

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 2本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : Genomic DNA

配列の起源 : ファージ

## 配列

```

GGATCCGATT GATTAAGACA CCTGTACCAA TTTTGGATT TCCTTCTATA 50
GAAGAGTTCA AAGTTTATCT TGACAAAAAC TTCTACAATG AGCAGCCTGT 100
TACTTTGCTG AAGAGTGACT TATCAGAGCT TCTTGATATG GTTATCAAGG 150
CAACTTCTGA GAAGGAACCT GAGCAGAAAG CTGAGAAGAA GACTAGTAAG 200
AAGTCCGATA AGAAGACTGA AAAGCCTGAG TAGTAACTTG AGGGGTTNCT 250
TGATAGCCCC TTTATAGAAC TTAGAAGGTA GCGAAATGAA AGAGCTTATA 300
GGTNAAGAGC TTGACATTGT TGATGCNAAG ACACAGAGAT ATATATCTAC 350
TGTTAAATTT CTTGGAATGA ATGATGCGAG TNATGCTTAC CCTCTCNACT 400
GCNTANTNCT AGACAAATTT GAGGTTTGTG GTNTTGATTT TAATGATGAT 450
AACTTTATAA GCTTTGATAA GGACGGTTTC TGGCGTGGTN AGANTCATCC 500
TCNAGCAAAT GAATTTGATA TGCGCCTAGT GATACCACAA AAAGGTNATC 550
CACNAAACGT AAAAGATATC CTTGTTNGAA GCCTA 585

```

配列番号 : 2-2

配列の長さ : 578

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 2本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : Genomic DNA

配列の起源 : ファージ

## 配列

```

GGATCCGATC AAGNGATGGT ATTAAGATGT CTATGAAGTT GGGTAAAATT 50
GTTGTTCCAA CATTTGCACA GATGCTGTCA AGCCTGACTG ATAAAGATAA 100
GAAAGAAGCT CCAATGGTTC CATTTAAAGA ACTTGTTGAA GCTTGTTTTG 150
ACAGAATTGA AGAAATCAAC CTTGAAGAAA TGGCTACCCT GTTATTTCAA 200
GGGGCAACTG TTGATGACTT CCCACTTAAT ATTGATACAT ACTTCCAAGC 250
AAACTACGGT GAATTTATTG ATTACTTAGC ATTTGCGCTG GAGGCAAAC 300
TCGGAAGTTT TTTCGAAGCA AGCATTTTCA AAAGCCTAAC TTCTCAGTAA 350
ACATGGGTNA CACTCTACAG ACACCACTGA CTGATGCTGC TGTNNAGGCN 400
ACCTATGAAG AAGCNGACGA NATGAAATTT GTGCTTGCTA TTTATGGTAT 450
GGAANGGTGT NAAGAAACAC TTGACCAACT CTTTGCTATG ACATTCTCTG 500
ATTTATTATC NTTGAGACAA TTTCTTGAGA TTCAGANGTC GTATNAAGAG 550
GAAATTGCTT ACNACGAAC  TNNAANAA 578

```

配列番号： 2-3

配列の長さ： 598

配列の型： 核酸

鎖の数： 2本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： Genomic DNA

配列の起源： ファージ

#### 配列

```

GGATCCGATT TCGTTACAGA CTTTCATGTAC AGAACATCTG CATTGTATTA 50
CTATGCAAGA GCTTGGTATA AAGACCTTGA CAACAGTCAG CAAAAGCTAA 100
TCAAAAGTGC TGGTGAATTT CTGGGAACAG TCGTGACAAT TGGTGGTGCA 150
GTTGCTGTAG TATCAAAATC AGTCAAGCTC CTAAGTGGTT TGGTCGGTGG 200
TGGCATCTTT GGTAATAATCT TACAAAGACT TGGTGTTAGT GCAGCAGGTA 250
CAGCAGCAGC AGGAGAAGCA GCCGCAGCGG CAGGTGGAGT TACAGCAACG 300
AGAATGGCAC TTGGTACTGT TGGCTCTGCA TTGATGCTAA NAAGTNCTAC 350
AGACCCNAAT GCTGCTAAAA ACTACAGTGA AGTTACACTT CCNAAACCAT 400
TTGAAAATGC TGTTGCNAAT ATTACAAACC CNAAGAGACC AATGTTCTTT 450
GATGAAAATG GTCAACTCCA GTTTGCACAG TATACTCNAG ACATTGAAGG 500
TTACAGAAAG TTAATTGACA ATGGCCTATC TAATTGGGAG ATTATCATGG 550
ATAAACTATC NACATCTATT GATAATTTTG CCAATAAGTT TAACCAGA 598

```

配列番号： 2-4

配列の長さ： 600

配列の型： 核酸

鎖の数： 2本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： Genomic DNA

配列の起源： ファージ

#### 配列

```

GGATCCGAAG ACGAAGCTAA GACTGGCACT GTAATCAACG GTGAAGAAAT 50
TCACGTAGTT GTTGACCGTG TATTCTTCAG CAAGCTGACT AAACACCCTA 100

```

```

AGATTCGTGA TGCCTATCTT GCACAGCAGA CCCCACTGGC TTGGCAACAG 150
ATTACTGGTT CTCTGAGAAC TGGTGGTACT GACGGCGTTC AGGCTCACAT 200
GAACACTTTC TACTACGGTG GTGTTAAGTT TGTCCAGTAC AACGGTAAGT 250
TCAAAGACAA GCGTGGTAAG GTTCATACTC TGGTGAGCAT TGATGGTGCT 300
GGTGCANAAG TTGGTGTTTG ACACGCTTTC CCTAACGTTT CTATGCTGGG 350
TGAAGCAAAC AACATCTTCN AAGTGGCTTA TGGCCCATGC CCTAAGATGG 400
GTTACGCNAA TNCCTTGGTC NNGGAACTGT TTGTTTTTCNA ATACCAAAAA 450
GACCGTGATG AANGTATTGA CTTCGAANCT CACTCTTACA TGCTGCCATA 500
CTGTNCTCGT CCTCAGTTGC TGGTANACGT TCGTTCTGAC GCTNAAGACG 550
AATAATATTC TTAANGAAGG TTATGAAATG TGTATNCAG GCGACCCACC 600

```

配列番号 : 2-5

配列の長さ : 603

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 2本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : Genomic DNA

配列の起源 : ファージ

配列

```

GGATCCGATG ATAAGATTGC AGAACTTGGT CGTTTTGATG ACTTCAAAAT 50
CTTCGTAGGT ACTCGTTTCG AGACAGATGC CTTCAAACAT TTAGAAGCAG 100
CATTACTAGA CCCTGCAACA GCAGGTTTTG CGGCTAAGTG GTTACCACGA 150
GTCAAACCAC GTCATAAGCA GTTTGTAAAA CGTTTCTGCA AGTTTGCCAA 200
CTTGAGTGAG AAAGAGTACC GCACACTGTT GTCTGCACTA TCTGATACAG 250
TTGAGCAAAA AATCTCTGCT AATGAGTTTG GTAAGATTGA CTACAGTAAG 300
ATTCCTTCAC TTGCTGCTGC ACGTTACCAA AACTGTTTA ACCGTNAAGA 350
TGGAGAGCGT TACAAAGCTT ACATCGAGTC CTTATCAGAA GGTGAGACTA 400
AGATTAACGC TGGTGCTGTT TACCCATACG ATGTGATTAA ATCTGTCAAG 450
TNTGGTAATG CNGATGTTGC TAATGAGCAG TGGAAAGCAC TACCAAACTG 500
GATNGCNGAA GGTGAAAACA TCTTGTGTAT GTCTGATGTA TCCAGTTCAA 550
TGTCTTGGGT GAATTTTGGC TCCNTTACTG CTCTGGGATA TTGGTGTTTC 600
NCT 603

```

配列番号 : 2-6  
 配列の長さ : 601  
 配列の型 : 核酸  
 鎖の数 : 2本鎖  
 トポロジー : 直鎖状  
 配列の種類 : Genomic DNA  
 配列の起源 : ファージ

## 配列

```

GGATCCGATT TGAAAAAGCT TTAAAGCTTG TTATGCCGCA TTTAGAATCT 50
GGAAAGCTGA CTTTAGAGAT GCTTAATAGG GTTATTCGGA GAGCTTATGA 100
AAATTAAAGA AGTGGTTCAA AAAGCAATGC TTGACAACTC AACTAAAGAT 150
GAAATGTACA AAGAAATTTG TGATAAGTTG AATTGTTCAA GACATGCTGC 200
TAAGGTTCTT GTCTCGTGTT TTATCTGGGA ATGCTCAGAA GCTTATATGC 250
AAGCTTATAT GCAACATGCA GTGTTTGAAA GTTCTAACTT ACTAGGTGAT 300
GTAGAAGCTA GTGAGAAGCT AAAAGAACCT GAAGTGAAAA CAGTCCCTAA 350
AGTTGGTAAT ACATACCCTC TTAAAGACCT CNAGACTGGA AAGATTATTG 400
CAAAAGGTGT AGTAGAGTCT GTCTACCATG ATGGTAAATA CTTACTTAAA 450
ATATTTGAGT NTGACAGCCA CTATACGCAC TTATGTGGGA TTACATTCTT 500
AGTAACNGAA GAAGACCTTA TTAGGAACAA TAGCAACAAG TTTGCAGTAC 550
CAGCTTACCA AGTTTTACGA TAATGGTGTG ATAGATATGG AAAAAGATAA 600
C                                                                 601
  
```

配列番号 : 2-7  
 配列の長さ : 607  
 配列の型 : 核酸  
 鎖の数 : 2本鎖  
 トポロジー : 直鎖状  
 配列の種類 : Genomic DNA  
 配列の起源 : ファージ

## 配列

```

GGATCCGATA ACTTCCACCA GATGTTACCC AAGCTCTTGA GTCAGCATTT 50
ATGAGGATTT TGGTAAAGTC CACTAAGCAG AATAATTTGC TTATCTCGGT 100
AAATGATATT CACAGTATTG TTGAAGGTGC TTTGGCAGAG GTCAATCACG 150
AGATTTATGA GTCTTACTCA ACATACAGAA ATTACCGTAA AGAGGTTGCT 200
CAAAATTGGG ACGAACTCTA CCAGAAGACT AAAGATACAC TCTTCTTAGG 250
TGACCGTGAA AATGCTAACT TTGACAGCAG TTTAATTTCT ACGAAAGGTT 300
CAATTATCCG TGGTTACCTG ACTAAAGAAA TCTTTAAACA GTATCATCTA 350
ACACCAGANG AACTTGAAAC CATTGAGAAA GGCTTTATCT ATATCCNCGA 400
TTTGAGAGAC CTGATTTTGT GTGGTATTAA CTGTTGCCTG TTTGACATTG 450
GTAAAGTACT AAAAGGTGGC TTTGAAATGT CCGGCNTTGA NTNCTGTGAA 500
CCTAAATCTG TTCTGTCAGC GTTGCAGGTT ATTGGGTGAC GTAATACTTT 550
CAGCAACTGC NCAGCAATTT GGTGGTTTTA CTTTAGCANA AATTGATNAG 600
GTAATTG                                           607

```

配列番号 : 2-8

配列の長さ : 585

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 2本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : Genomic DNA

配列の起源 : ファージ

配列

```

GGATCCGATC TACTTTGAAG GTGATGTACA CATTTCTAAA AACTTGTATG 50
TAACAGAAGA AGTACATGGT TCAGATTTTA TCAGTGACAC AACTGGTGTG 100
AGCTTTAATG AACACACGCA CCATTATTAC TGGACAGACC CTGCTGGTGA 150
GGCTGATACT ACAGAGGCAC AATAATGAAA ACAGACTTTG CATTAAATCT 200
AGGTGGTGAC TATGTTGCCA CTTTGGGTTC AGATTCANTG TATGTGGCTC 250
ATGGTGATTT AAAGATTACT GGTAACCNA AATTAGAATTAT CCCNNAAGAT 300
AATAAAGCTA CTCACGTTGC TCAAAGACTC CATATTAGAT GCCTTCTAAG 350
GGCTGGTGAA GTCTTCTTTA ATACATCTGC TGGGTTCCCN TATTTACAAC 400
TTGCCNAATT TAAACNGAAA ACTTCTATCT TTGACAATTA TATGAAAGCT 450
TACCTTGTTG AAACAAGANA TGTGTCTAAC ATCTATAACT ATTCTTCTTC 500
NATGGACAAC GCTCAAAGAA AAGTGACTGT TAATTTTGAT GCCACTACTA 550
CNACNGATAT TTTAACNGAC ATTACGCCAG AAGTT                                           585

```

配列番号： 2－10  
配列の長さ： 563  
配列の型： 核酸  
鎖の数： 2本鎖  
トポロジー： 直鎖状  
配列の種類： Genomic DNA  
配列の起源： ファージ  
配列



```

GGATCCGATT TTTAATGGTG TACAGACAGT TGTTACGGAT AATGAAGGTC 50
TGATTGTTAA AAACCTCTACT CAGAATAGAC CATTATATAT TCGTGGTG TG 100
GACACTACTA ATGTATCAAG ATGGTGGATT GGTGTTGGTG GTGTTGATAC 150
GAATGATGTT ACCCTAAATA ACAGTTATTC TGGAACCCAA TTGGTTCTCG 200
GGAATACAAC ATCATACATT AACAAAACAT TGACTATTGC TGGACAAGTT 250
CAACCTTCAG ATTTCTCTAA CTTAGATGCT AGATACTTTA CGCAAAGTGC 300
TAGTGATAGT AGATACCTAA GAATCAGAAG CACTANCTTC AATGTGGGAA 350
ACACTGATAA GTGGGCTAAA ATTGCCACTG TTGTGATGCC ACAATCAGCA 400
TCCACTGCTG TTATTGAAGT ATTTGGTGGG TCAGGTTTTA ATATTAATAC 450
ACCAAACCAA GCANGTAAAT GTGAAATTGT TCTGCGAACT TCAAATAACA 500
ATCCAAAGGG CTTAAATGTT GTTGCTTGGA GAACATCANA NAACACCATT 550
ATCANGGATA TTG 563

```

配列番号： 3-1

配列の長さ： 528

配列の型： 核酸

鎖の数： 2本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： Genomic DNA

配列の起源： ファージ

配列

```

AAGCTTGACA ATCCCTGAAG AGGATATCAG AGACAGTATT GTACAAGGTA 50
TTAATGCCTA CGGAAGAACT CTTAAGGTTG GTAGTGACGT TATCCCTAAC 100
AGAATCTACG GATATATCTA TGACGTAATT AAAGGTATTG AGATTAACGA 150
GGTTAAAGTA GCCTTATCAA ACAGCCAATC AGTTCCACCT AGTGACGGAC 200
AATATACTAC AGCAAGAATT ACTGTTGACG GTGACCAATA TACTGTTTGG 250
GAAAGCAGCC AGTATACCAT CACTAAGGAG TAACAATGTT TGAAAAGATT 300
GATAGTGTTT ATTATAAAAC ACTTGATGAA AGAACTGTAA CACAGTTTAA 350
AGATAAGTTT ATCTATACAA GCATCTTGAA AGCAATCACT GATGAGTTAC 400
AAACATTAGA GGATGTTTGC TGGCAGATGC ACACAGAGAG AAATATCAGG 450
ACGTCAGTAG GCCAACAACT TGATAATATT GGCTCACTGA TTAAAGTTCC 500
TAAGACCTTT AGGTGCAGAT GATGAAAC 528

```

配列番号 : 3-2  
 配列の長さ : 5 4 3  
 配列の型 : 核酸  
 鎖の数 : 2 本鎖  
 トポロジー : 直鎖状  
 配列の種類 : Genomic DNA  
 配列の起源 : ファージ

## 配列

GAAGATGATA	AAGCTACTCA	GGTTGCTCAA	AGACTCCATA	TTAGATGCCT	50
TCTAAGGGCT	GGTGAAGTCT	TCTTTAATAC	ATCTGCTGGG	TTCCCATATT	100
TACAACCTGC	CAAATTTAAA	CAGAAAACCT	CTATCTTTGA	CAATTATATG	150
AAAGCTTACC	TTGTTGAAAC	AAGAGATGTG	TCTAACATCT	ATAACTATTC	200
TTCTTCAATG	GACAACGCTC	AAAGAAAAGT	GACTGTTAAT	TTTGATGCAA	250
CTACTACAAC	AGATATTTTA	ACAGACATTA	CGCAAGAGGT	TAATATCTAA	300
TGGCAGGATT	AACTACAACA	GGATTACAAA	CTCTAAGATA	TCAGGAAATT	350
TTTGATAATA	TCAAATCAAG	ACTTCTTAGA	GATATCTCAC	CAAACCTTGA	400
CGTTTCTGAA	GATAGCCAAT	TAGGTCTCTT	CCTAGCTTCA	ATTGCAAGGT	450
CTTTAGCAGA	TACACATGAG	ATTCTNTCAG	AAATCTATGA	CGGCGGGGAC	500
AATTGACAAG	GCTGAAANGA	TTTAACCTTG	ATGATATCAC	AGC	543

配列番号 : 3-3  
 配列の長さ : 5 5 7  
 配列の型 : 核酸  
 鎖の数 : 2 本鎖  
 トポロジー : 直鎖状  
 配列の種類 : Genomic DNA  
 配列の起源 : ファージ

## 配列

CAATGAAGGA	TGCTCGTGCA	ATTTGCAATG	AGTTGAATGC	AAAGATTGGT	50
AAGAAATGCA	AAGACTGGAA	GCCAGTAAAA	ACAGTTAAAA	CTGTGAAGTA	100
CTATAACAGT	CATGTTGTTA	ACCACTTTGA	GCTTGAGTCA	AGTCGCTACA	150

CAGGATTGAT	TGATGCACCA	TATACACCAA	TTGAGTTTGA	AGTTTCTCGT	200
ATGACTCAGG	TAGCAGTTGT	TAAAGACTAC	TTGAAATCAG	TTGGTTGGAT	250
TCCAGATGAC	TGGAACTACA	AGAAAGATTTC	AGACGGTCGC	CCTGTCAAAG	300
TTTGTCGTTT	CANAGACAAC	AAAAAGATGA	TTACAAAGCA	TCCTAAGTGG	350
CAGGAGATGG	TTGAACGGTG	TGGGTTGAGT	TATGTTGAAC	ACGAAAGTGT	400
CCAGTACATC	GAACATAACT	GGTCTGTGAA	GAAGTNCACG	GATTTGCTTG	450
AACCTTGCTT	AATCCGTACT	TCCCAAAACT	TACTGAATCT	TCTTATGATA	500
CGATTGAANG	TGAGCTTGGA	CAGAAGATTG	CTAAATACTA	TACTTTGATG	550
CCCGACG					557

配列番号 : 3-4

配列の長さ : 528

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 2本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : Genomic DNA

配列の起源 : ファージ

配列

AAGCTTGGAA	TGAGTATGTT	GAAGCATTTG	GTCACGCAGA	TGGACTGAAG	50
AGAATTACCA	AGTACCCTAA	GACAAAGTAT	CGTCAGCAGG	TACGTAACGG	100
TGAGATGCAG	ACATATGAAA	TCAAGCCATT	TGGTAAGCCA	ACTACAAAGA	150
TTTTTAACAT	TGAAAAGAGA	AATTGCTATA	CACCAACCAA	CTCTGTAACT	200
GGTGAAGAGT	ACAAGGAGGG	TTTTGTAGCA	ATGAAGGATG	CTCGTGCAAT	250
TTGCAATGAG	TTGAATGCAA	AGATTGGTAA	GAAATGCAAA	GACTGGGAGC	300
CAGTNAAAAC	AGTNAACTG	TGGAAGTACT	ATTACAAGCA	AGGTGNTTAC	350
CACTTTTGAG	CTTTGAGTCA	AGTCGCTACA	CAAGGATTGA	TTGATGCANC	400
ATATACACCA	ATTGAGTTTG	AAGTTTCNCC	GTATGACTCA	NGTAGCAATT	450
GTTAAAGACT	ACTTGAAATC	AGTTGGGTGG	ATTCCAGATG	ACTGGAACTA	500
CAAGAAAGAT	TCAGACGGTC	GCCCTGT C			528

配列番号 : 3-5

配列の長さ : 528

配列の型 : 核酸

鎖の数： 2本鎖  
 トポロジー： 直鎖状  
 配列の種類： Genomic DNA  
 配列の起源： ファージ

## 配列

AAGCTTTCTT	CGTCATATAA	TGAGTAAGAT	ACTTTAACAA	ATGCGTATTT	50
TGGTGTGGT	CTGCTAAAGT	AAATATTATG	TGCTAAACCA	CCTAAATCAT	100
GGGCTGTACC	AAAAATTGAG	CCGTAAGCTC	TAATACCAGC	AGGTTTTGTA	150
TCCCAGATTG	CTTGAGCAAC	ATTATCATTT	TGACCACCGA	CTACGACAAT	200
CTTAAAAGAT	TTTGGTGGAA	GACCTTCTGA	GTTTCGTCTCT	TCAGTATCAN	250
TTTCAACACC	TGAAGCATCT	GAGACACCTT	GAANCCTTTT	AACAGCAGCT	300
ACAATTGCAT	CCAAAGTCCC	TANACCAAGT	AACTGGTAAA	GNGTCNAAAT	350
ATCNCTGNCN	AAGTTCTGNG	TCAGTTTCCT	CGGTTCTAAC	AATTGNTAAG	400
TCANACCTGN	TATAGATGCT	GTCAAGACCA	TCAACAAGTT	GTCTCAATCT	450
CAATAAGAGT	CCCAAGCTAA	AGCAGGAATA	GCAACAACCT	CTTCAGCCAC	500
TACATCTGAG	ATAAGTTGTA	ATCTTTGT			528

配列番号： 4-1  
 配列の長さ： 517  
 配列の型： 核酸  
 鎖の数： 2本鎖  
 トポロジー： 直鎖状  
 配列の種類： Genomic DNA  
 配列の起源： ファージ

## 配列

AAGCTTCGTT	CCAACCTACCT	CTCAAGACTT	TTACAAGTCC	AGCTTCAGAA	50
GCAGCAGAAA	ACCCCGCAAA	TCGGGTAAGT	TTGTCTTTAN	TTGTGGTTT	100
AGCTCTTGCT	CGATAACCTT	TCTCGGCAAG	TTTCCTGATG	AGGGATGTTG	150
CGTAGGATTT	ACCAGCAGCG	CCTGGGTCTT	GAGGGATAAA	AATACCAGTT	200
CGCTTACCGT	CACTTTCAGC	AGTCAAATTA	ATTTGTGTTT	CGACTCCAGA	250
GGGTCTATCT	CTAAATCTTA	CTACATCAAT	GATATAATAA	GCAACCGTCT	300
TTTTTAAGAT	TTACCATCTT	AACAACCTGCT	GGCCAATCCG	GGTTAAGGNT	350

AAACCCAAGA	TGGGAAAAGT	TGCTGGCTAA	AGTCCCATGC	TCTGACATCG	400
AATACATCTT	CTGGGAGTGA	ATCAACAATT	TCACACCATT	GNCTTTGCCA	450
AATAAGTTTG	AACCTTCTGC	ACGAAGCCTT	CCAAGTTACC	GAAACGAAGT	500
CTTGCAACGT	TTACAGG				517

配列番号： 4-2  
 配列の長さ： 3 5 3  
 配列の型： 核酸  
 鎖の数： 2本鎖  
 トポロジー： 直鎖状  
 配列の種類： Genomic DNA  
 配列の起源： ファージ

## 配列

TGTTAAAGT	TGTGAATGCAA	AATCACCACG	GCTACAAGGT	ACGGTATTTA	50
GTTTCATCT	CAAGTGACTGA	AAACCTTGAG	TCAGTTCAAT	TTGTAAGTGC	100
TCCATTACA	TAATTGTGGTA	ATGCTCTTTA	GGAATACCAT	AAGATGATGC	150
TTTCTCAGC	ATGATAGCGTN	NAACTTCTT	AGCATACGGT	ACAANTNCCT	200
TATCAATCT	CTGCTAAAGTN	AAACCACCNA	ATTGCTGTGC	ANTTGCTGAA	250
ANTNCTACG	TCNCCAATAAC	CTGCAACGCT	GACAGTACAG	ATTTAGGTTC	300
ACAGTACTC	CATGCCGGACA	TTTCAAANCC	NCCNTTTANT	ACTTTACCNA	350
TGT					353

配列番号： 4-3  
 配列の長さ： 4 1 6  
 配列の型： 核酸  
 鎖の数： 2本鎖  
 トポロジー： 直鎖状  
 配列の種類： Genomic DNA  
 配列の起源： ファージ

## 配列

GGTGCTCCGT ATGATGCAGG TTCAATTGCT TGGGGTAACG CACAGCTAAC	50
TGGCGTAGCT GCTTCTCTAC AGCCATCTAA TCAGAGACCT CTGACAAGTA	100
TTCAGAANTC AGCTTTANAT GCACGTCCT GTAACTTTAT TGACCTTGAT	150
GGTGGTGTTT CAGTGGTTCG TAGANGGATT ACTTCTGGTG GGGAAATGGAT	200
TNATATCATC CGTGGTGTTG ACTGGTTAAA ATCNGACCTG AAAACTTCTC	250
TGAGAGACTT GCTAATTAA CAGAAAGGTG GTAAGGATTA CTTANGATGA	300
TACTGGTATT ACCCGTATTC CCAAGTCATT GAAACCTCTC TGCCCANACG	350
CAGTCNACAG AAACCTCCTG TCATCTTANA CACTTAATGT TCCTAAATCC	400
TCTCAANTTG CTTTGG	416

配列番号： 4-4

配列の長さ： 5 1 7

配列の型： 核酸

鎖の数： 2本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： Genomic DNA

配列の起源： ファージ

#### 配列

AAGCTTACCA ATCTTTCTAA TCTTAGCCCA TCTTTTAACG TGACCTTCAT	50
CACCATCAAT CGGGTTGTCA TATGTCTCCA TCCATCTGAA TCCAAAAGGT	100
AAGTGTCCTT TCTTCTCACT GTAAAATGGA ACTACAAAAG GTGCTAAGAT	150
AACTGCTAAG ATTGCTGCCA ATGTTTCTAG CAAAGCTAAG AAAATCCATG	200
AAGCATACTT CAAGTATCTC ATTTAAATAG CCTCTTTAAA TTGGCGCAGG	250
ATAAGGGATT CGAACCCCTA TTAACAGCTT CGTAGACTGT TGCTCTATCC	300
ATTTGAACTA ATCCTGCTTA CCTACAAGAA CACCATACAG TTTTTCACAA	350
GAGTTGTTTT TACGCCTGTT TTTGAATGAC GCTATAAACT TTTTGTCAAT	400
TGATTTATTA CTCATAGTGT TCTCCTAAAA TTGGTGTTCC AAGACGGNTT	450
CGAACCGTCA CTAGTACAAG GGTGAGCTT GCATCCTCTG CCAATTGGGA	500
TACTGGGACA TGGNACT	517

配列番号： 4-5

配列の長さ： 5 2 8

配列の型： 核酸  
鎖の数： 2本鎖  
トポロジー： 直鎖状  
配列の種類： Genomic DNA  
配列の起源： ファージ

## 配列

AAGCTTTGAC	CCAGAAAGAC	TGAATAAGTG	GGCATCATGG	GCAGATAAGC	50
GTGGAATTAT	CTGGTCAGAA	GTCACTATGG	AAGCCATGAA	ACGTGTCTAT	100
GAGGGTTGCA	CTACAAAAGA	GATGCACCAA	GCCATGATTG	ATGTTTGTGT	150
TGATAAGCAA	ACTCAAGAGT	ACTCAGATAT	GGCTGGACGG	CTACTTCTGG	200
GAATTATCTA	CAAAGAAGCC	TTTGGAGGTT	TACTAAGGTT	CCTACGCTGG	250
TTACCTTCGN	TAAAAATATG	GAGAGAGCAA	GACTTTGGGA	GAAGATGGAC	300
TATTCACAAG	AAAGAGCTTG	AATATCTGCA	AGGGTACATT	GTGCACTCAN	350
AAAGATATCT	CTTACGGTTA	TGCAGTCTTG	AAACAGTTCA	AGAGACAAGT	400
ATGGTATCCG	TGATATTAAA	ACGGGAAGAC	TTTTTGAGTC	ACCACAATTT	450
ATGTTTATGG	GTATGGCTAT	GAAAGCCTTT	GAGAAGCAAC	CAAAGCACCG	500
TAGACTGCAA	GATGTTATCA	AGCTGTAC			528

## 請求の範囲

- 1 特定の病原性細菌に対してだけ高い特異性を有することを特徴とする新規なバクテリオファージ。
- 2 請求の範囲 1 項に記載のバクテリオファージにおいて、前記病原性細菌が腸管出血性大腸菌であることを特徴とする。
- 3 請求の範囲 1 項または 2 項に記載のバクテリオファージにおいて、前記バクテリオファージが配列番号 1-1 ないし 1-4、配列番号 2-1 ないし 2-10、配列番号 3-1 ないし 3-5 または配列番号 4-1 ないし 4-5 でそれぞれ示される塩基配列を有するフラグメントを含む DNA をそれぞれ持つことを特徴とする。
- 4 バクテリオファージを制限酵素マイナスならびに修飾酵素ポジティブで病原性細菌に感染させて増幅し、高温にて処理することによって欠失 DNA を含むバクテリオファージだけを選択してバクテリオファージをスクリーニングすることを特徴とするバクテリオファージのスクリーニング法。
- 5 請求の範囲 1 項ないし 3 項のいずれか 1 項に記載のバクテリオファージを含むことを特徴とする新規バイオ殺菌材料。
- 6 請求の範囲 5 項に記載の新規バイオ殺菌材料において、バクテリオファージを安定化させるための安定化剤もしくは保存剤が含有されていることを特徴とする。
- 7 請求の範囲 5 項または 6 項に記載の新規バイオ殺菌材料において、前記バクテリオファージが単独または 2 種以上の性質の異なるバクテリオファージ



ジのカクテルからなることを特徴とする。

8 請求の範囲 1 項ないし 3 項のいずれか 1 項に記載のバクテリオファージまたは請求項 5 ないし 6 のいずれか 1 項に記載のバクテリオファージを含む新規バイオ殺菌材料を病原性細菌を殺菌するために使用することを特徴とするバクテリオファージを病原性細菌を殺菌するための使用方法。

9 請求の範囲 8 項に記載のバクテリオファージの殺菌のための使用方法において、前記バクテリオファージまたは前記殺菌バイオ材料を、その病原性細菌が感染したりもしくは感染したと予想される対象に適用して、その病原性細菌を殺菌したりまたはその病原性細菌が感染するのを予防するために使用することを特徴とする。

10 請求の範囲 8 項または 9 項に記載のバクテリオファージの殺菌のための使用方法において、前記バクテリオファージが単独または 2 種以上の性質の異なるバクテリオファージのカクテルからなることを特徴とする。

11 病原性細菌を培地で培養し所定の菌体数になった段階で、バクテリオファージを該培地に添加して、該バクテリオファージを該病原性細菌に感染させた後、該病原性細菌を除去して該バクテリオファージの培養液を得ることを特徴とするバクテリオファージの培養液の製造方法。

12 請求の範囲 11 項に記載のバクテリオファージの培養液の製造方法において、前記培地にカルシウムイオンなどの金属イオンが含有されていることを特徴とする。

13 アミノ酸などの食品材料を用いた pH が 6.5 から 7.5 に調整されていることを特徴とするバクテリオファージの安定化剤。

1.4 請求の範囲 1.3 項に記載のバクテリオファージの安定化剤において、前記アミノ酸がグリシン、アルギニンまたはリジンであることを特徴とする。

1.5 請求の範囲 1 項ないし 3 項のいずれか 1 項に記載のバクテリオファージを病原性細菌の検出のために使用することを特徴とする病原性細菌検出方法。

1.6 請求の範囲 1.5 項に記載の病原性細菌検出方法を使用することを特徴とする病原性細菌検出試薬もしくは試薬キット。

図1

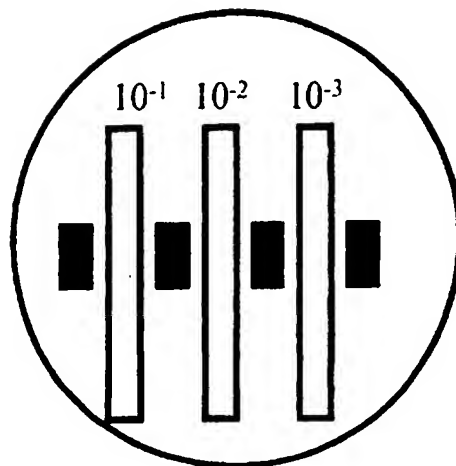
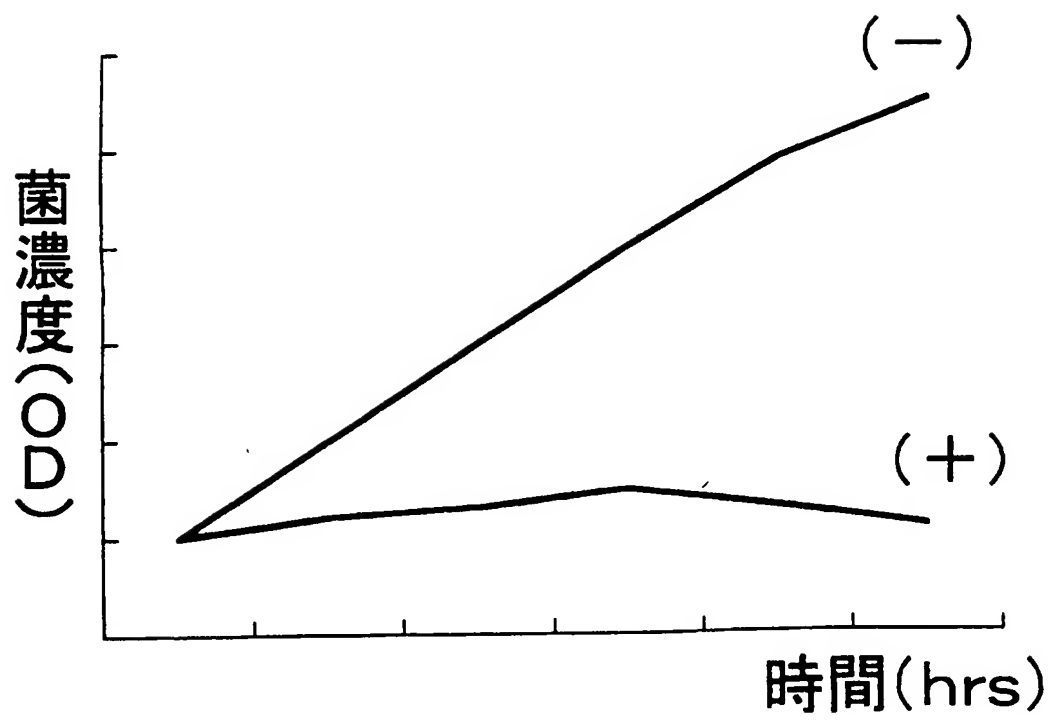
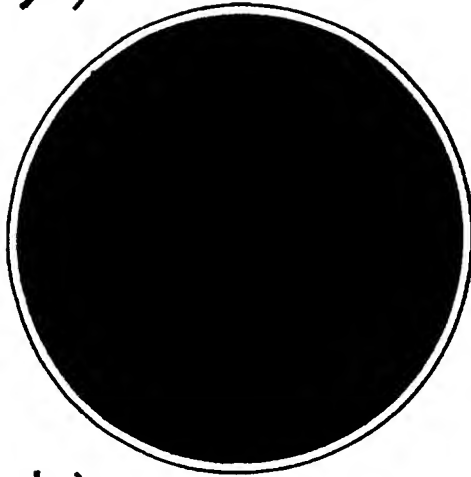


図2

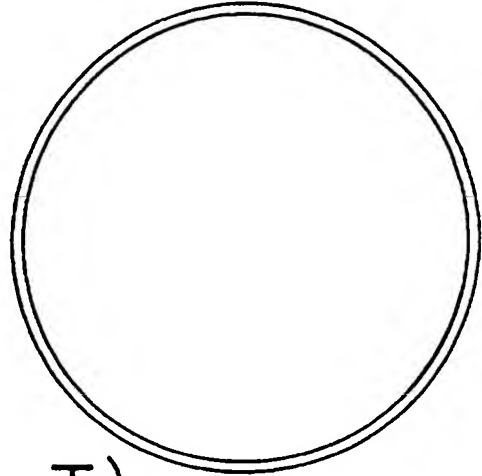


2/2  
第3図

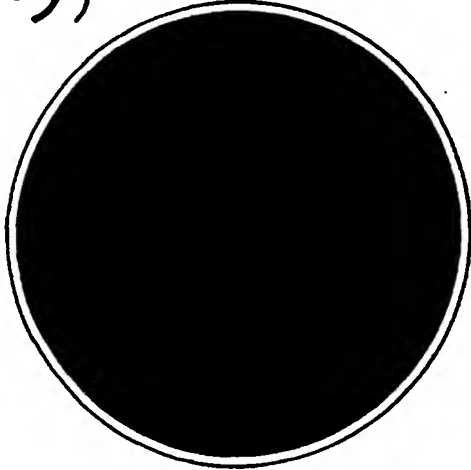
ア)



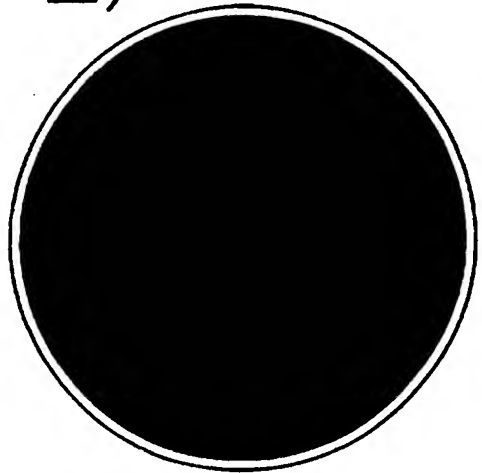
イ)



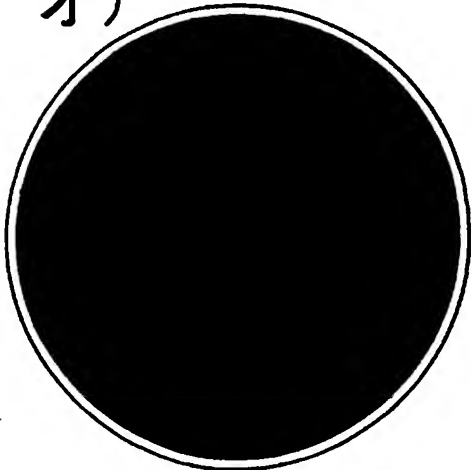
ウ)



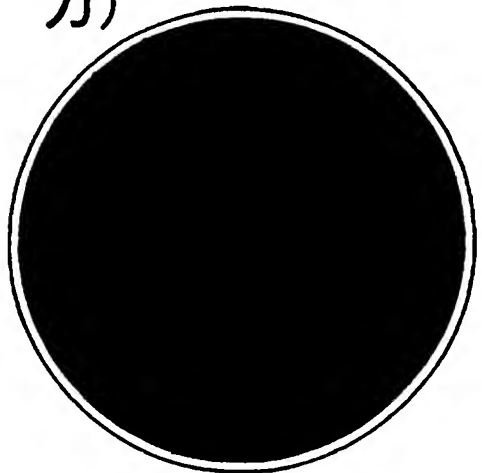
エ)



オ)



カ)



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/02957

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl<sup>6</sup> C12N15/11, C12N7/00, C12N7/02, A23L3/3463, A61K2/16

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl<sup>6</sup> C12N15/11, C12N7/00, C12N7/02, A23L3/3463, A61K2/16

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

GENETYX-CD, BIOSIS(DIALOG), WPI(DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	J. Food Prot., Vol. 53, No. 11 (1990) A.B. Ronner et al.; "Isolation and Characterization of a Coliphage Specific for <u>Escherichia coli</u> 0157:H7", pages 944 to 947	1, 2, 11, 12, 15, 16 / 3-10, 13, 14

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"A" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

December 9, 1997 (09. 12. 97)

Date of mailing of the international search report

December 24, 1997 (24. 12. 97)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>1</sup> C 1 2 N 1 5 / 1 1, C 1 2 N 7 / 0 0, C 1 2 N 7 / 0 2, A 2 3 L 3 / 3 4 6 3, A 6 1 K 2 / 1 6

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>1</sup> C 1 2 N 1 5 / 1 1, C 1 2 N 7 / 0 0, C 1 2 N 7 / 0 2, A 2 3 L 3 / 3 4 6 3, A 6 1 K 2 / 1 6

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

GENETYX-CD, BIOSIS(DIALOG), WPI(DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/A	J. Food Prot., 第53巻, 第11号(1990) A. B. Ronner et al.; " Isolation and Characterization of a Coliphage Specific for <u>Escherichia coli</u> O157:H7", 第944-947頁	1, 2, 11, 12, 15, 16/3- 10, 13, 14

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

09. 12. 97

国際調査報告の発送日

24. 12. 97

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

植野 浩志

印

4 B

9 4 5 2

電話番号 03-3581-1101 内線 3449